

## PRODUCTION OF PROTEIN CONTAINING MAMMAL SELENOCYSTEINE IN ESCHERICHIA COLI

**Publication number:** JP10309193

**Publication date:** 1998-11-24

**Inventor:** KOISHI RYUTA; NAKAMURA KATSUMICHI;  
SERIZAWA NOBUKI

**Applicant:** SANKYO CO

**Classification:**

**- International:** C12N15/09; A61K38/16; A61P1/16; A61P3/08;  
A61P3/10; A61P7/00; A61P27/02; A61P29/00;  
A61P35/00; A61P43/00; C07H21/04; C12N1/21;  
C12P21/02; C12R1/19; C12N15/09; A61K38/16;  
A61P1/00; A61P3/00; A61P7/00; A61P27/00;  
A61P29/00; A61P35/00; A61P43/00; C07H21/00;  
C12N1/21; C12P21/02; C12P21/02; (IPC1-7):  
C12N15/09; A61K38/16; C07H21/04; C12N1/21;  
C12P21/02; C12N1/21; C12R1/19; C12P21/02;  
C12R1/19

**- European:**

**Application number:** JP19970120443 19970512

**Priority number(s):** JP19970120443 19970512

**Report a data error here**

### Abstract of JP10309193

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce the subject protein obtained by a genetic manipulation, including a specific amino acid sequence including selenocysteine, having activities for reducing thioredoxin, and used for prevention and treatment of disease caused by an active oxygen and a free radical.

**SOLUTION:** This protein is a new protein obtained by a genetic manipulation, including an amino acid sequence of the formula, in which Xaa of amino acid number 503 is selenocysteine, or a new protein having the amino acid sequence with substituted, deleted or inserted one or more amino acids at one or more positions without the amino acid number 503 in the amino acid sequence, in which the Xaa of the amino acid number 503 is selenocysteine. The protein has activities for reducing thioredoxin, and is useful as a preventive and a treating agent for disease caused by an active oxygen and a free radical, such as arteriosclerosis, diabetes, ischaemia injury, edema, inflammation, liver disorder, chemical carcinogenesis, metastasis, autoimmune disease, Parkinson's disease and Alzheimer's disease.

```
Ala Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro
Glu Asp Leu Pro Lys Ser Tyr
  1                      5
 10                      15
Asp Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly
Gly Ser Gly Gly Leu Ala Ala
                20                      25
                |
                |
                |
Ala Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val
Thr Lys Arg Ser Gly Ala Ser
                485
490                      495
Ile Leu Gln Ala Gly Cys Xaa Gly
                500
```

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-309193

(43) 公開日 平成10年(1998)11月24日

C12N 15/09

A61K 38/16

識別記号

ZNA

ABE

ABL

ABY

ACS

FI

C12N 15/00

C07H 21/04

C12N 1/21

C12P 21/02

A61K 37/14

ZNA A

B

C

ABE

審査請求 未請求 請求項の数19 OL (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-120443

(22) 出願日

平成9年(1997)5月12日

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72) 発明者 小石 徹太

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72) 発明者 中村 健道

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72) 発明者 芹澤 伸郎

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(74) 代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

(54) 【発明の名称】 哺乳類セレノシステイン含有タンパク質の大腸菌での製造法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子操作によって得られ、チオレドキシン還元活性を有し、活性酸素またはフリーラジカルに起因する疾患に対する予防または治療剤として有用な、分子中にセレノシステインを含むタンパク質を提供する。

【解決手段】 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであることを特徴とするタンパク質、または、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503以外の1または2以上の位置において1または2以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列を含み、アミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであり、チオレドキシン還元活性を有することを特徴とするタンパク質。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであることを特徴とするタンパク質、または、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503以外の1または2以上の位置において1または2以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列を含み、アミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであり、チオレドキシン還元活性を有することを特徴とするタンパク質。

【請求項2】 形質転換された原核細胞生物の培養物から得られることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】 形質転換された大腸菌の培養物から得られることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質。

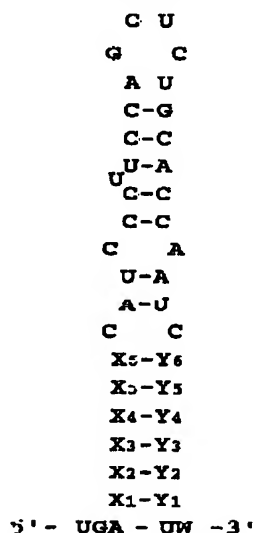
【請求項4】 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであることを特徴とするタンパク質。

【請求項5】 形質転換された原核細胞生物の培養物から得られることを特徴とする、請求項4記載のタンパク質。

【請求項6】 形質転換された大腸菌の培養物から得られることを特徴とする、請求項4記載のタンパク質。

【請求項7】 請求項1乃至6のいずれか1つに記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列および大腸菌において該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503がセレノシステインに翻訳されるために必要なヌクレオチド配列を含むことからなるDNA。

【請求項8】 配列表の配列番号2または3に示される



(I)

(式中、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Uはウラシルを表し、WはA、GまたはUのいずれかを表し、X<sub>1</sub>乃至X<sub>6</sub>は任意のヌクレオチド配列を表し、

ヌクレオチド配列を含む、請求項7記載のDNA。

【請求項9】 請求項7または8記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項10】 請求項9記載の組換えベクターを保持する形質転換細胞。

【請求項11】 大腸菌であることを特徴とする、請求項10記載の形質転換細胞。

【請求項12】 請求項10または11記載の形質転換細胞を培養し、次いで該培養物からチオレドキシン還元活性を有するタンパク質を回収することを特徴とする、該タンパク質の製造方法。

【請求項13】 請求項1乃至6のいずれか1つに記載のタンパク質を含むことからなる医薬。

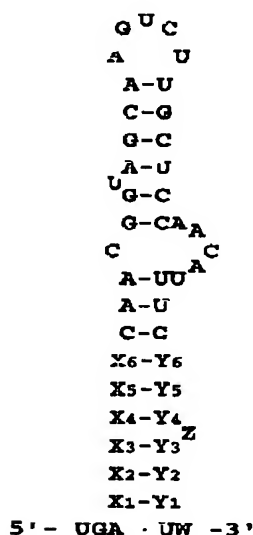
【請求項14】 請求項1乃至6のいずれか1つに記載のタンパク質を含むことからなるチオレドキシン還元剤。

【請求項15】 請求項1乃至6のいずれか1つに記載のタンパク質を含むことからなる、活性酸素またはフリーラジカルに起因する疾患に対する予防または治療剤。

【請求項16】 下記の(i)乃至(ii)記載の工程からなる、C末端の2アミノ酸残基のうちいずれか1つのアミノ酸がセレノシステインである哺乳類由来のタンパク質の製造方法：

(i) セレノシステインをコードする部分および終止コドンを含むリボヌクレオチド配列が、下記の式(I)または(II)に示されるようなステムループ型の二次構造を形成し得るmRNAに転写されるDNAを含む大腸菌用組換えベクターを作製する：

【化1】



(II)

Y<sub>1</sub>乃至Y<sub>6</sub>はX<sub>1</sub>乃至X<sub>6</sub>に相補的なヌクレオチド配列を表し、ZはX<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>のいずれにも相補的でないヌクレオチドを表し、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> および/またはX

4 X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> が終止コドンである。) ;

( i i ) 上記組換えベクターを大腸菌に導入し、形質転換体を選択する ;

( i i i ) 得られた形質転換大腸菌をセレンを含む培地中で培養後、セレノシステインが取込まれた組換えタンパク質を回収する。

【請求項17】 X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> が終止コドンであることを特徴とする、請求項16記載の方法。

【請求項18】 哺乳類由来のタンパク質が、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであることを特徴とするタンパク質であるか、または、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503以外の1または2以上の位置において1または2以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列を含み、アミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであり、チオレドキシン還元活性を有することを特徴とするタンパク質である、請求項16記載の方法。

【請求項19】 哺乳類由来のタンパク質が、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaa がセレノシステインであることを特徴とするタンパク質である、請求項16記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、チオレドキシン還元活性を有し、活性酸素またはフリーラジカルに起因する疾患の予防または治療剤として有用な、分子中にセレノシステインを含むKM-102細胞由来の還元酵素様因子(KM-102-derived reductase like factor)に関する。さらに本発明は、該因子を遺伝子操作により製造する方法、該方法において用いられるDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えDNAベクターを保持する形質転換細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】 セレンは硫黄の同族元素であるが、金属性、非金属性を併せ持つ点が特徴で、硫黄にはない特異的な反応性を示す。一般にセレン化合物は、対応する硫黄化合物より還元力が強く、酸化還元に関連した独特の反応に関与する。

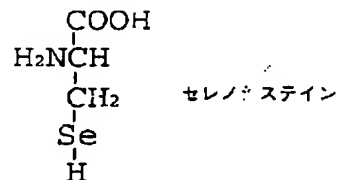
【0003】 哺乳類、鳥類、および魚類は、いずれもセレンを必須微量元素として要求し、セレンの欠乏により心筋の変性、肝組織の壊死、脾萎縮、筋ジストロフィー様症状や成長抑制などが起こることが明らかにされている[Flohe, L., et al (1976) Metabolism and function. Glutathione peroxidase. In Glutathione, 115-135 参照]。

【0004】 従来知られているセレン含有タンパク質の多くは、システインにおいて硫黄がセレンに置換されたアミノ酸であるセレノシステインがそのアミノ酸配列中

に取り込まれており、主に活性中心として酸化還元反応に関与すると考えられている。

【0005】

【化2】



【0006】 哺乳類由来のセレン含有タンパク質としては、グルタチオンペルオキシダーゼファミリーが最もよく知られている[Ursini, F., et al (1995) Methods Enzymol. 252B, 38-53 参照]。グルタチオンペルオキシダーゼファミリーに属する酵素はグルタチオン、またはチオレドキシン存在下で、過酸化水素、あるいは有機過酸化物を還元的に分解することから、哺乳類や鳥類にとっては活性酸素やフリーラジカルを消去する反応を触媒する作用を持つ抗酸化酵素として重要である。「活性酸素」は大気中の酸素よりも活性化された酸素およびその関連分子の総称であり、「フリーラジカル」は不対電子を1つまたはそれ以上有する分子または原子をいうが、これらは一般に不安定で、脂質、タンパク質、または核酸を変性させる活性を有する。

【0007】 KM-102細胞由来の還元酵素様因子(KM-102-derived reductase like factor、KM31-7タンパク質：以下「KDRF」という)[特開平8-131178号公報およびKoishi, R., et al (1997) J. Biol. Chem. 272, 2570-2577参照]は、ジクロロフェノール・インドフェノール還元活性を有するタンパク質として単離されたが、一方でセレン含有タンパク質であるヒトのチオレドキシン還元酵素(thioredoxin reductase：以下「TR」という)とアミノ酸配列がほぼ同一であることが判明している[Tamura, T., et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 1006-1011, Gladyshev, V. N., et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 6146-6151, Gasdaska, P. Y., et al (1995) FEBS Lett. 373, 5-9参照]。TRは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ酸(以下「NADPH」という)存在下で酸化型チオレドキシンを還元する酵素である。ヒトTRは、大腸菌のTRより基質特異性が広く、細菌から哺乳類までの由来の異なるチオレドキシンに作用するほか、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(以下「PDI」という)をも基質とする[田村隆(1996) 生物工学 74, 317-318参照]。PDIは、酸化されたアスコルビン酸(ビタミンC)を還元するデヒドロアスコルビン酸還元活性を有しており[Wells, W. W., et al (1990) J. Biol. Chem. 265, 15361-15364参照]、TRはアスコルビン酸を介したビタミンEのリサイクル経路[Stoyanovsky, D. A., et al (1995) Current Eye

Res. 14,181-189 参照]にもPDIを介して関与していることが示唆されている。アスコルビン酸やビタミンEは抗酸化作用を持つ物質であり、生体内の活性酸素やフリーラジカルを消去する活性を有する。活性酸素やフリーラジカルは、動脈硬化症、糖尿病、虚血障害(再かん流障害、虚血性心疾患、脳虚血、虚血性腸炎など)、浮腫、血管透過性亢進、炎症、胃粘膜障害、急性脾炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝障害、パラコート病、肺気腫、化学発癌、癌転移、成人呼吸窮迫症候群、汎発性血管内血液凝固症候群(DIC)、白内障、未熟児網膜症、自己免疫疾患、ポルフィリー血症、溶血性疾患、地中海性貧血、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん発作、紫外線障害、放射線障害、凍傷、熱傷など多くの疾患の重大な原因の1つであることから、TRは生体内でチオレドキシン、あるいはアスコルビン酸やビタミンEを介して活性酸素やフリーラジカルに由来する酸化的ストレスを軽減し、これらの疾患に対して有効な予防または治療薬となり得る。

【0008】しかしながら、セレン含有タンパク質のセレノシステイン残基の取込み機構は、哺乳類と大腸菌では異なる[Berry, M. J., et al (1993) EMBO J. 12, 3315-3322参照]。すなわち、大腸菌においては、セレノシステインの取込みに際して、mRNAがセレノシステイン残基をコードするコドンの3'末端側に隣接するようにステムループ構造をとることが必須であると考えられている。大腸菌由来のセレン含有タンパク質であるギ酸デヒドロゲナーゼ(以下「FDH」という)のセレノシステイン取込み機構については詳細に研究されており[Heider, J., et al (1992) EMBO J. 11, 3759-3766参照]、この機構を利用してメタン生成細菌のfdhA遺伝子産物へセレノシステイン残基を導入する試みがなされている[Heider, J., et al (1992) J. Bacteriol. 174, 659-663 参照]。一方、哺乳類では、mRNAの3'末端非翻訳領域中に存在するステムループ構造が重要な役割を有する。したがって、クローニングされた哺乳類由来のセレン含有タンパク質のcDNAを大腸菌で発現させたとしても、通常セレノシステインは取込まれない[Rocher, C., et al (1991) Gene 98, 193-200 参照]。セレノシステインが活性中心であるグルタチオンペルオキシダーゼの場合と同様に、KDRFがチオレドキシン還元活性を示すにはそのアミノ酸配列中にセレノシステインが取込まれることが重要であると考えられるが、上記のような取込み機構の相違から、哺乳類由来のタンパク質を、セレノシステインを含む組換えタンパク質として大腸菌で生産した例はなく、また、大腸菌に限らず、KDRFまたはヒトTRを、セレノシステインを含む組換えタンパク質として製造した例もない。さらに、N末端の25残基を欠失し、セレノシステインを含むKDRFまたはヒトTRがチオレドキシン還元活性を有するか否かについても知られていない。

#### 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、チオレドキシン還元活性を有し、活性酸素またはフリーラジカルに起因する上記の疾患に対する予防または治療剤として有用な、分子中にセレノシステインを含むKDRFを、遺伝子操作によって大腸菌で製造する方法、該方法において使用されるDNAおよび該方法によって得られる組換えタンパク質を提供することにある。

#### 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1) 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaaがセレノシステインであることを特徴とするタンパク質、または、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503以外の1または2以上の位置において1または2以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列を含み、アミノ酸番号503のXaaがセレノシステインであり、チオレドキシン還元活性を有することを特徴とするタンパク質、(2) 形質転換された原核細胞生物の培養物から得られることを特徴とする、

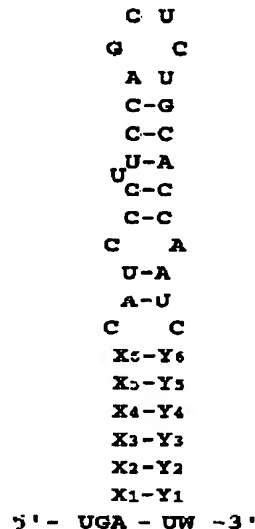
(1)記載のタンパク質、(3) 形質転換された大腸菌の培養物から得られることを特徴とする、(1)記載のタンパク質、(4) 遺伝子操作によって得られ、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaaがセレノシステインであることを特徴とするタンパク質、。

【0011】(5) 形質転換された原核細胞生物の培養物から得られることを特徴とする、(4)記載のタンパク質、(6) 形質転換された大腸菌の培養物から得られることを特徴とする、(4)記載のタンパク質、

(7) (1)乃至(6)のいずれか1つに記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列および大腸菌において該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503がセレノシステインに翻訳されるために必要なヌクレオチド配列を含むことからなるDNA、(8) 配列表の配列番号2または3に示されるヌクレオチド配列を含む、(7)記載のDNA、(9) (7)または(8)記載のDNAを含む組換えベクター、(10) (9)記載の組換えベクターを保持する形質転換細胞、(11) 大腸菌であることを特徴とする、(10)記載の形質転換細胞、(12) (10)または(11)記載の形質転換細胞を培養し、次いで該培養物からチオレドキシン還元活性を有するタンパク質を回収することを特徴とする、該タンパク質の製造方法、(13) (1)乃至(6)のいずれか1つに記載のタンパク質を含むことからなる医薬、(14) (1)乃至(6)のいずれか1つに記載のタンパク質を含むことからなるチオレドキシン還元剤、(15) (1)乃至(6)のいずれか1つに記載のタンパク質を含むことからなる、活性酸素またはフリーラジカルに起因する疾患に対する予防または治療剤、

(16) 下記の(i)乃至(iii)記載の工程からなる、C末端の2アミノ酸残基のうちいずれか1つのアミノ酸がセレノシステインである哺乳類由来のタンパク質の製造方法:

(i) セレノシステインをコードする部分および終止コドンを含むリボヌクレオチド配列が、下記の式(I)ま



(I)

【0013】(式中、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Uはウラシルを表し、WはA、GまたはUのいずれかを表し、X<sub>1</sub>乃至X<sub>6</sub>は任意のヌクレオチド配列を表し、Y<sub>1</sub>乃至Y<sub>6</sub>はX<sub>1</sub>乃至X<sub>6</sub>に相補的なヌクレオチド配列を表し、ZはX<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>のいずれにも相補的でないヌクレオチドを表し、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> および/またはX<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub>が終止コドンである。);

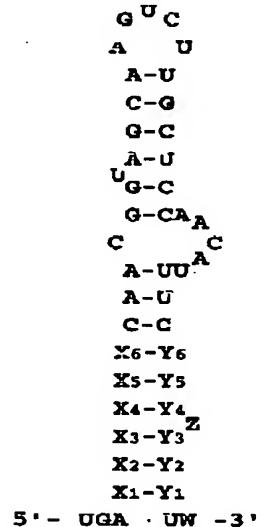
(ii) 上記組換えベクターを大腸菌に導入し、形質転換体を選択する;

(iii) 得られた形質転換大腸菌をセレンを含む培地中で培養後、セレノシステインが取込まれた組換えタンパク質を回収する、(17) X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub>が終止コドンであることを特徴とする、(16)記載の方法、(18) 哺乳類由来のタンパク質が、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaaがセレノシステインであることを特徴とするタンパク質であるか、または、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503以外の1または2以上の位置において1または2以上のアミノ酸が置換、欠失または挿入されているアミノ酸配列を含み、アミノ酸番号503のXaaがセレノシステインであり、チオレドキシン還元活性を有することを特徴とするタンパク質である、(16)記載の方法、(19) 哺乳類由来のタンパク質が、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列中のアミノ酸番号503のXaaがセレノシステインであることを特徴とするタンパク質である、(16)記載の方法、に関する。

たは(II)に示されるようなステムループ型の二次構造を形成し得るmRNAに転写されるDNAを含む大腸菌用組換えベクターを作製する:

【0012】

【化3】



(II)

【0014】本発明者らは、大腸菌のセレン含有タンパク質であるギ酸脱水素酵素のサブユニットfdhFまたはfdnGのセレノシステイン取込み認識機構を利用することにより、大腸菌を宿主とする組換えタンパク質発現系において、真核生物由来のタンパク質であるKDRFの分子中にセレノシステインを導入することに成功した。さらに、N末端の25残基を欠失したセレノシステイン含有KDRFが優れたチオレドキシン還元活性を有することを見出し、本発明を完成させた。

【0015】なお、本発明において、「チオレドキシン還元活性」とは、NADPH存在下で、酸化型チオレドキシンを還元する酵素活性をいう。

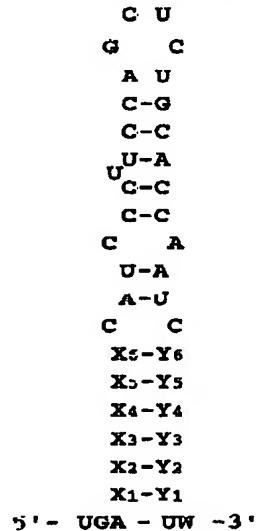
【0016】

【発明の実施の形態】本発明のチオレドキシン還元活性を有するタンパク質は、まず大腸菌のセレノシステイン含有タンパク質の遺伝子に存在するセレノシステイン残基挿入配列を、セレノシステイン残基をコードするヌクレオチド配列の直後に連結したDNAを含む組換えベクターを作製し、該組換えベクターで形質転換された大腸菌を培養することにより調製することができる。

【0017】具体的には、C末端の2アミノ酸残基のうちいずれか1つのアミノ酸がセレノシステインであるような哺乳類由来のタンパク質であれば、以下に記載する方法に従って分子中にセレノシステインが取込まれた組換えタンパク質を大腸菌に生産させることが可能である。

【0018】まず、セレノシステインをコードする部分

および終止コドンを含むリボヌクレオチド配列が、下記の式(I)または(II)に示されるようなステムループ型の二次構造を形成し得るmRNAに転写されるDN



## (I)

【0020】(式中、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Uはウラシルを表し、WはA、GまたはUのいずれかを表し、X<sub>1</sub>乃至X<sub>6</sub>は任意のヌクレオチド配列を表し、Y<sub>1</sub>乃至Y<sub>6</sub>はX<sub>1</sub>乃至X<sub>6</sub>に相補的なヌクレオチド配列を表し、ZはX<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>のいずれにも相補的でないヌクレオチドを表し、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub>および/またはX<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub>が終止コドンである。)

【0021】次にこの組換えベクターを大腸菌に導入し、形質転換体を選択する。得られた形質転換大腸菌をセレンを含む培地中で培養後、セレノシステインが取込まれた組換えタンパク質を回収する。

【0022】UGA配列は、通常の場合終止コドンとして翻訳を停止させるが、上記式(I)または(II)に示されるような二次構造を形成する場合は、上記式中のステムループ開始点に存在するUGA配列がセレノシステインコドンとして機能する。したがって、該UGA配列の次の終止コドンが存在するX<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub>で表わされるヌクレオチド配列の3'末端側に、

CAUCGGUUGC AGGUCUGCAC CAAUCY<sub>6</sub>Y<sub>5</sub>Y<sub>4</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>UW

(fdhシグナル：配列表の配列番号4)；または

CAACGGUAGC AAGUCUUUCU CCAACAUUUG Y<sub>6</sub>Y<sub>5</sub>Y<sub>4</sub>ZY<sub>3</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>UW

(fdnシグナル：配列表の配列番号5)

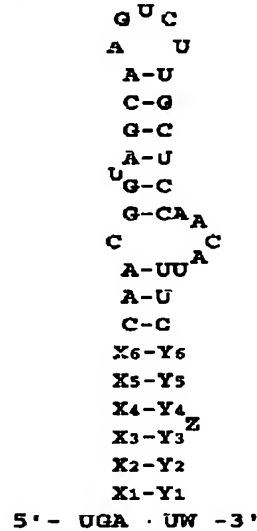
なるヌクレオチド配列が連結したmRNAに転写されるように、セレノシステインを含有せしめるタンパク質をコードするDNAの3'末端側非翻訳領域を改変することにより、本発明のDNAを調製することができる。

【0023】そのような、C末端の2アミノ酸残基のうちいずれか1つのアミノ酸がセレノシステインであるような哺乳類由来のタンパク質としては、前記のKDRFまたはヒトTRが好適であるが、配列表の配列番号1に

Aを含む組換えベクターを作製する：

【0019】

【化4】



## (II)

示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が最も好適である。該タンパク質をコードするDNA(終止コドンを含む)は、特開平8-131178号公報に記載された方法に従ってKDRFをコードするcDNAを単離し、これを鋳型として配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を増幅するようポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という) [Saiki, R. K. (1988) Science 239, 487-491 参照] を実施することにより取得することができる。

【0024】セレノシステインを取込ませようとするタンパク質をコードする遺伝子の3'末端側非翻訳領域を改変する方法としては、上記fdhシグナルまたはfdnシグナルのセンス鎖およびアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをホスホアミダイト法 [Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 参照] 等の公知の方法で合成し、これを二本鎖としてから、例えばリガーゼ反応で目的のタンパク質をコードするDNAのセレノシステインコドンの後の終止コドンの3'末端と連結する方法や、上記fdhシグナルまたはfdnシグナルと、コーディング領域および終止コドンを含む3'末端側領域の数ヌクレオチド以上の配列とが連結したDNAのアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマー、およびコーディング領域の5'末端側のセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、目的のタンパク質をコードするDNAを鋳型とするPCRを実施する方法などを挙げることができる。

【0025】このようにして作製された本発明のDNAを、大腸菌用のベクターに組込むことにより、本発明の組換えベクターを作製することができ、さらに該ベクターを大腸菌に導入することにより、形質転換体を取得す



ることができる。また、ベクターにプロモーターおよび形質発現に関わるヌクレオチド配列を導入することにより、形質転換体に本発明のDNAを発現せしめることが可能である。

【0026】大腸菌を本発明のDNAで形質転換させるには、宿主と適合し得る大腸菌由来のレプリコンすなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターを用いる。また、ベクターは、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

【0027】プロモーターとしては、トリプトファンプロモーター（trp）、ラクトースプロモーター（lac）、トリプトファン・ラクトースプロモーター（tac）、リボプロテインプロモーター（lpp）、バクテリオファージ由来のラムダ（ $\lambda$ ）PLプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子プロモーターTu（tufB）等を挙げることができ、いずれも本発明のタンパク質の産生に使用することができる。

【0028】また、大腸菌での発現後の成熟体タンパク質の単離精製を簡便にする目的で、セレノシステインを取込ませようとするタンパク質と当業者に周知のタンパク質との融合タンパク質をコードするDNAを調製し、該DNAで大腸菌を形質転換することも可能である。その際、当業者に周知のタンパク質をコードするDNAは、セレノシステインを取込ませようとするタンパク質をコードするDNAの5'末端側に同一読み枠（リーディングフレーム）で連結される。そのような融合タンパク質発現システムとしては、例えばマルトース結合タンパク質との融合タンパク質発現システム[Guan, C., et al. (1987) Gene 67, 21-30参照]、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質発現システム[Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Gene 67, 31参照]、クローバーイエローベインウイルスプロテアーゼとの融合タンパク質発現システム[特開平8-80194号公報参照]等が挙げられるが、クローバーイエローベインウイルスプロテアーゼとの融合タンパク質発現システムが好適である。

【0029】以上のごとくして作製された本発明の組換えベクターで、ハナハンの方法[Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580 参照]等当業者に周知の方法を用いて大腸菌を形質転換し、アンピシリン耐性などを指標にして形質転換体を選択することができる。この形質転換体は、当業者に周知の方法に従って培養することができ、この培養により大腸菌細胞内に本発明のタンパク質が産生される。このときの培地の組成や培養条件は、用いたベクター、宿主大腸菌株、上記融合タンパク質等の性質に応じて、好適なものを選択することができる。例えば、上記のクローバーイエローベインウイルスプロテアーゼとの融合タンパク質発現システムを用いる場合、該プロテアーゼの活性を最大にするためには、

28℃での培養が最適である。また、組換えDNAの発現を誘導するために、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド（以下「IPTG」という）を培地中に添加することもできる。

【0030】上記方法により形質転換体の細胞内に生産される本発明のタンパク質は、その物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常のタンパク質沈澱剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組み合わせなどを例示できる。

【0031】以上に記載した方法により、容易に高収率・高純度で本発明のタンパク質を大量に製造できる。このようにして得られる本発明のタンパク質の諸性質は、下記実施例に詳述する通りであり、該タンパク質は、その酵素活性より、前記した各種の分野で有用である。

【0032】一般に真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子などで知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ[例えば、Nishi, T., et al. (1985) J. Biochem. 97, 153-159を参照]、この多型現象によって、一個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の置換はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

【0033】配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるチオレドキシン還元活性を有するタンパク質のアミノ酸配列の中の、アミノ酸番号503のセレノシステイン以外の一つもしくは二つ以上の部位において、一つもしくは二つ以上のアミノ酸残基が置換、欠失もしくは挿入されているタンパク質でも、チオレドキシン還元活性を有することが多い。[天然型のアミノ酸配列が置換したアミノ酸配列を有するタンパク質が、天然型タンパク質と同等の活性を有する例として、例えば、インターロイキン2（IL-2）遺伝子のシステインに相当するヌクレオチド配列をセリンに相当するヌクレオチド配列に変換して得られたタンパク質が、IL-2活性を保持することが知られている（Wang, A., et al. (1984) Science 224, 1431-1433参照）。]これらのタンパク質を本発明においては、チオレドキシン還元活性を有するタンパク質の同効物とよぶ。すなわち、それら人工合成されたタンパク質が、チオレドキシン還元活性を有する限り、それらのタンパク質は、全て本発明に含まれる。また、これらのタンパク質をコードする、同効のヌクレオチド配列からなるDNAも全て本発明に含まれる。それらのタンパク質の製造においても、セレノシステインを取込ませるために、前記の方法を用いることができる。

【0034】このような各種の本発明のタンパク質をコ

ードするDNAは、上記チオレドキシン還元活性を有する因子の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M., et al. (1984) Nature 310, 105-111参照] などの常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。

【0035】尚、所望アミノ酸に対するコドンは、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R., et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 143-174参照]。さらにこれらヌクレオチド配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した、部位特異的変異導入法 (site specific mutagenesis / Mark, D. F., et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666参照) などに従うことができる。また、任意の一つもしくは二つ以上のアミノ酸残基を欠失させた改変体を作製するためには、エキソヌクレアーゼ Ba131等を用いてDNAを末端から削る方法 (岸本 利光ら、"続生化学実験講座1・遺伝子研究法II" 335-354)、カセット変異法 (岸本 利光、"新生化学実験講座2・核酸III組換えDNA技術" 242-251) などに従うことができる。

【0036】なお、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して定法に従い決定できる。

【0037】上記のごとくして得られた本発明のタンパク質に、セレノシステインが取込まれているか否かを確認する方法としては、C末端部分ペプチドのマスマスペクトル解析を行う方法、セレンの放射性同位元素である<sup>75</sup>Seを形質転換体培養用の培地に添加して、精製後のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動し、ゲルのオートラジオグラフィを行って<sup>75</sup>Seの取り込みを調べる方法等を挙げることができる。

【0038】また、本発明のタンパク質が、チオレドキシン還元活性を有することを検定するためには、例えばNADPH、酸化型チオレドキシンおよび本発明のタンパク質を混合した反応液の340nmの吸光度を測定する方法を挙げることができる。

【0039】本発明により生産されるチオレドキシン還元活性を有するタンパク質は、動脈硬化症、糖尿病、虚血障害 (再かん流障害、虚血性心疾患、脳虚血、虚血性腸炎など)、浮腫、血管透過性亢進、炎症、胃粘膜障害、急性肝炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝障害、パラコート病、肺気腫、化学発癌、癌転移、成人呼吸窮迫症候群、汎発性血管内血液凝固症候群 (DIC)、白内障、未熟児網膜症、自己免疫疾患、ポルフィリー血症、

溶血性疾患、地中海性貧血、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん発作、紫外線障害、放射線障害、凍傷、熱傷などの病態、疾患の予防、治療において、単独または他の治療薬との併用投与で用いられる。

【0040】上記の症状を処置するために用いる本発明の組成物は、医学的に許容される担体と治療上有効な量のチオレドキシン還元活性を有するタンパク質との混合物からなる。本組成物は、種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、または、注射剤、点滴剤、坐薬などによる非経口投与をあげることができる。

【0041】注射剤または点滴剤として投与される場合、該タンパク質は発熱物質を含まず、非経口的に許容可能な水溶液の態様で用いられる。pH、等張性、および安定性を考慮して調製される上記の非経口的に許容され得る該タンパク質溶液の調剤は、当業者の技術範囲内にある。

【0042】上記症状の処置における投与量及び投与方法は、本薬剤の作用に影響を及ぼし得る要因、例えば、患者の症状、体重、性、年齢、食餌、何らかの感染の重症度、投与の時間およびその他の臨床上影響を与える要因を考慮して診察する医師によって決定され得る。通常、経口投与では成人に対して1日約0.01mg乃至1000mgであり、これらを1回又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回約0.01mg乃至1000mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与することができる。ここで使用されるタンパク質は、いずれも生体由来のものの遺伝子組換え体であるので、それらの毒性は低い。

【0043】

【実施例】以下に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0044】参考例。セレノシステインを含まない組換えKDRFの調製。

(1) pN1a31-7Vの構築

クローバーイエローベインウイルスプロテアーゼ [特開平8-80194号公報参照] とKDRF (配列表の配列番号7のアミノ酸番号1~528に示されるアミノ酸配列) との融合タンパク質をコードするDNAを保持する発現プラスミドベクター pN1a31-7Vを、以下に記載する方法に従って構築した。

【0045】第一段階PCR

まず、以下に記載するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した：

5'-CATAGGATGC TCCAACAA -3' (#1: 配列表の配列番号8) ;

5'-TCATTCCAAG TTGTGTTTGT GAAA -3' (#2: 配列表の配列番号9) ;

5'-GGTCAGCACA AATTTC CA -3' (#3: 配列表の配列番号10) ;

5'- AAACACAAC TGGATGAAC AATT -3' (#4: 配列表の配列番号11)。

【0046】オリゴヌクレオチドは自動DNA合成機  
(モデル394: (株)パーキンエルマー・ジャパン・ア  
プライドバイオシステムズ事業部製)を用い、ホスホア  
ミダイト法 [Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H.  
(1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 参照] に従

って合成された。

【0047】次いで、以下に記載する条件でPCRを実  
施した。

【0048】

反応液組成:

[反応a]

鋳型DNA	プラスミドpUCKM31-7 DNA	
	(特開平8-131178号参照)	1 $\mu$ g
プライマー	#1	100 pmol
	#2	100 pmol
	10倍濃度Taqポリメラーゼ緩衝液*	10 $\mu$ l

滅菌水で全量を100  $\mu$ lとした後、5単位のTaqポリ  
メラーゼ(宝酒造(株)社製)を加えた;

\*10倍濃度Taqポリメラーゼ緩衝液: 500mM  
トリス塩酸(pH8.3)、500mM 塩化カリウ  
ム、15mM 塩化マグネシウム、100mM dNT

Ps、2mg/ml ゼラチン。なお「dNTPs」は  
dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの等濃度  
混合液をいう。

【0049】

[反応b]

鋳型DNA	プラスミドpKSUN9 DNA	
	(特開平8-80194号参照)	1 $\mu$ g
プライマー	#3	100 pmol
	#4	100 pmol
	10倍濃度Taqポリメラーゼ緩衝液	10 $\mu$ l

滅菌水で全量を100  $\mu$ lとした後、5単位のTaqポリ  
メラーゼ(宝酒造(株)社製)を加えた;

温度条件(a、b共通): 72℃で3分保温した後、  
94℃で1分、55℃で2分、72℃で3分のサイクル  
を30回くり返してから、72℃で10分保温した。

【0050】第二段階PCR

第一段階PCRの後、以下に記載する条件でPCRを実  
施した。

【0051】

反応液組成:

鋳型DNA	反応aの反応液	5 $\mu$ l
	反応bの反応液	5 $\mu$ l
プライマー	#1	100 pmol
	#3	100 pmol
	10倍濃度Taqポリメラーゼ緩衝液	10 $\mu$ l

滅菌水で全量を100  $\mu$ lとしてから、5単位のTaq  
ポリメラーゼを加えた;

温度条件: 第一段階に同じ。

【0052】PCR終了後、反応液をフェノール・クロ  
ロホルム抽出の後、エタノール沈殿を行い、沈殿したD  
NAを滅菌水100  $\mu$ lに溶解した。このうち50  $\mu$ l  
分を制限酵素Xho Iで消化してから、フェノール・ク  
ロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行った。沈殿し  
たDNAをさらに制限酵素Sma Iで消化した後、フェ  
ノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行っ  
てから、0.8%アガロースゲル電気泳動した。

【0053】泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色した  
後、紫外線照射下で目的のDNAに相当するバンド(約  
1 kbp)部分のゲル片を剃刀刃で切り取り、DNA抽  
出キット(ジーンクリーンキット: フナコシ(株)社よ

り購入)を添付プロトコールに従って使用することによ  
り、該ゲル片中のDNAを回収した(以下この操作を  
「切り出し」という)。

【0054】一方、pSR $\alpha$ 31-7 DNA [特開平  
8-131178号参照] 7  $\mu$ gを制限酵素Xba I  
で消化後、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノ  
ール沈殿を行ってから、さらに制限酵素Sma Iで消化  
した。消化後、0.8%のアガロースゲル電気泳動を行  
い、約1 kbpのDNA断片を切り出した。

【0055】また、pKSUN9 DNA 5  $\mu$ gを制  
限酵素Xba Iで消化後、フェノール・クロロホルム抽  
出およびエタノール沈殿を行い、さらに制限酵素Sma  
Iで消化してから再びフェノール・クロロホルム抽出お  
よびエタノール沈殿を行い、沈殿を40  $\mu$ lの滅菌水に  
溶解した。

【0056】このXbaIおよびSmaI消化したpKSUN9 DNA溶液 40μlに5μlの1M トリス塩酸(pH8.0)および2.5単位の大腸菌由来アルカリホスファターゼ(宝酒造(株)社製)を加え、65℃で30分間保温した(以下同様の操作を「脱リン酸化」という)。脱リン酸化反応終了後、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行った。

【0057】このXbaIとSmaIで消化し脱リン酸化したpKSUN9と、XbaIとSmaIで消化したpSRα31-7 DNA由来の1kbp断片をDNAライゲーションキット(宝酒造(株)社製)を用いて連結した後、大腸菌JM109株((株)ニッポンジーン社製)をハナハンの方法[Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580]で形質転換した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドをXbaIとSmaIで消化したときに1kbpの断片を生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpNIa31-7SXを得た。

【0058】次に、pNIa31-7SX DNA 5μgを制限酵素SmaIで消化後、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、さらに制限酵素XhoIで消化した。再びフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行ってから、脱リン酸化を行った。

【0059】このSmaIおよびXhoI消化したpNIa31-7SXと、XhoIおよびSmaIで消化した上記第二段階PCR産物とを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌JM109株を形質転換

反応液組成:

[反応c]

鋳型DNA	pNIa31-7V	DNA	150ng
プライマー	#5		10nmol
	#6		10nmol
10倍濃度	LA PCR緩衝液(キットに添付)		5μl
dNTP混合液(キットに添付)			5μl

滅菌水で全量を49.5μlとした後、5単位/μlのLA Taqポリメラーゼ(キットに添付)を0.5μl加えた;

[反応d]

鋳型DNA	pNIa31-7V	DNA	150ng
プライマー	#7		10nmol
	#8		10nmol
10倍濃度	LA PCR緩衝液		5μl
dNTP混合液			5μl

滅菌水で全量を49.5μlとした後、5単位/μlのLA Taqポリメラーゼを0.5μl加えた;  
温度条件(c、d共通): 98℃で1分、68℃で3分のサイクルを30回くり返した。

反応液組成:

鋳型DNA	反応cの反応液	3μl
	反応dの反応液	3μl

した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドをXhoIで消化したときに一箇所だけ切断されて約1kbpの断片のみを生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpNIa31-7Vを得た。(図1)。

【0060】(2) pNIa31-7Kの構築  
クローバーイエローベインウイルスプロテアーゼとN末端の2残基を欠失したKDRF(配列表の配列番号7のアミノ酸番号26~528に示されるアミノ酸配列)との融合タンパク質をコードするDNAを保持する発現プラスミドベクターpNIa31-7Kを、上記(1)で得られたpNIa31-7Vを材料とし、以下に記載する方法に従って構築した。

【0061】第一段階PCR

まず、以下に記載するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した:

5'-GGTCAGCACA AATTTCCAGG AAAAGAGTTC-3'

(#5:配列表の配列番号12);

5'-GCCGTTTCATT TTTAGTAGCT TTGCTTGGA TGAACAATT-3'

(#6:配列表の配列番号13);

5'-AATTGTTTCAT TCCAAGCAAA GCTACTAAAA ATGAACGGC-3'

(#7:配列表の配列番号14);

5'-TTAGCAGCTG CCAGACCTCC TGAGCCACCT-3'

(#8:配列表の配列番号15)。

【0062】次いで、LA PCRキット・バージョン2(宝酒造(株)社製)を使用して、以下に記載する条件でPCRを実施した。

【0063】

【0064】第二段階PCR

第一段階PCRの後、以下に記載する条件でPCRを実施した。

【0065】

プライマー #5	10nmol
#8	10nmol
10倍濃度 LA PCR緩衝液	5μl
dNTP混合液	5μl

滅菌水で全量を49.5μlとした後、5単位/μlのLA Taqポリメラーゼを0.5μl加えた；

温度条件： 第一段階に同じ。

【0066】PCR終了後、反応液をフェノール・クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿を行い、沈殿したDNAを滅菌水100μlに溶解した。このDNAを制限酵素XhoIとBglIIで消化し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行って精製してから、8%のポリアクリルアミド電気泳動(100V、3時間、室温)を行った。泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で目的のDNAに相当するバンド(約400bp)部分のゲル片を剃刀刃で切り取り、微量遠心チューブに移して粉碎した。このものに300μlの溶出緩衝液(0.5M 酢酸アンモニウム、10mM 酢酸マグネシウム、1mMEDTA(pH 8.0)、0.1% SDS)を加え、37℃で一晩保温した後、15000rpmで遠心して上清を回収し、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈殿を1回行って、沈殿を滅菌水20μlに溶解した。

【0067】一方、pNla31-7V DNA 5μgを制限酵素XhoIとBglIIで消化後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ってから脱リン酸化した。脱リン酸化の後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行って沈殿を回収した。

【0068】このXhoIとBglIIで消化したpNla31-7Vと、XhoIとBglIIで消化した第二段階PCR産物とを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得

られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドをXhoIとBglIIで消化したときに約400bpの断片を生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpNla31-7Kを得た。(図2)。

【0069】(3) 発現およびN末端アミノ酸配列の確認

上記(2)で得られたpNla31-7Kを保持する形質転換大腸菌株を50μg/mlのアンピシリンを含む3mlのLB培地(1% トリプトン、0.5% イーストエキストラクト、0.1% グルコース、0.5% 塩化ナトリウム)中で、37℃で一晩培養した。この培養液 1mlを、50μg/mlのアンピシリンおよび1μMの亜セレン酸ナトリウムを含むLB培地100mlに加え、培養液の600nmの吸光度が0.9になるまで37℃で振盪培養してから、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(以下「IPTG」という)を最終濃度1mMになるように添加し、28℃で二晩振盪培養した。この培養液を4℃、7000rpmで20分間遠心してから上清を捨て、沈殿した菌体を10mM トリス塩酸(pH7.26)中に懸濁した。この懸濁液中の菌体を、超音波破碎機(ソニケーター：大岳製作所(株)社製)を用いて破碎した(ピリオド：0.5、出力：50ワット、2分間を2回繰り返した)後、4℃、7000rpmで20分間遠心し、上清を回収した。この上清中の成分を、ファルマシア社製のFPLCシステムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを以下に記載する条件で実施することにより分画した：

カラム：DEAEセファロース・ファストフロー(ファルマシア社製)をXK 16/20(φ2.0×20cm：ファルマシア社製)に10ml充填；

溶離緩衝液：A) 10mM トリス塩酸(pH7.26)  
B) 10mM トリス塩酸(pH7.26)、  
0.2M 塩化ナトリウム；

流速：1ml/分；

溶出条件：以下の順序で溶出した：

10% B液(B液：A液=1：9(v/v)の混合溶液)10mlで3回溶出、

(以下、B液：A液=x：(100-x)(v/v)の混合溶液を「x% B液」という)

20% B液 10mlで3回溶出、

30% B液 10mlで3回溶出、

40% B液 10mlで6回溶出、

50% B液 10mlで6回溶出、

100% B液(B液のみ)10mlで3回溶出；

フラクション：10ml/チューブ。

【0070】得られた溶出液のうち、3～24番目の分画から100 $\mu$ lずつ採取して、それぞれに1/10容のトリクロロ酢酸（以下「TCA」という）を加え、1500rpmで5分間遠心した。沈澱をそれぞれ100 $\mu$ lのアセトンで洗浄し、1500rpmで10分間遠心し、沈澱を風乾した後、それぞれ5 $\mu$ lの滅菌水に溶解した（以下、上記の一連の操作を「TCA沈澱」という）。

【0071】これらに5 $\mu$ lずつの2倍濃度サンプル緩衝液（124mM トリス、4%ラウリル硫酸ナトリウム、10% 2-メルカプトエタノール、20% グリセロール、0.2% ブロモフェノールブルー）を加え、全量をレムリ法 [Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685参照] に基く8%ゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下「SDS-PAGE」という）に供した（20mA定電流、室温、90分）。泳動終了後のゲルを、銀染色試薬キット（銀染色試薬「第一」：第一化学薬品（株）社製）を用いて銀染色した。

【0072】その結果、13番目の分画（40% B液 Ala-Lys-Leu-Leu-Lys-Met-Asn-Gly-Pro-Glu（配列表の配列番号16））であった。この配列の2～10番目のアミノ酸配列は、配列表の配列番号7のアミノ酸番号26～34に示されるアミノ酸配列と一致した。すなわち、pN1a31-7Kを保持する形質転換大腸菌株により産生される約55kDaのタンパク質は、CYVV N1aプロテアーゼとKDRF (Lys<sup>26</sup>) との融合タンパク質が、N1aプロテアーゼによりその特異的切断点であるGlu-Alaの間で切断されて生成したもの（以下「Ala-KDRF (Lys<sup>26</sup>)」）であることが確認された。

【0074】（4） C末端の解析  
上記（3）で精製したAla-KDRF (Lys<sup>26</sup>) 0.5mg相当分にTCA沈澱操作を行って、風乾後の沈澱を6M グアニジン塩酸および10mM エチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）を含む0.5M トリス-塩酸緩衝液（pH8.6）400 $\mu$ lに溶解した。このものに250mM ジチオスレイトール（以下  
カラム：AM-301

（粒径120Å、4.6×100mm、ワイエムシー社製）；

溶離緩衝液：A）0.1% トリフロロ酢酸を含む水

B）0.1% トリフロロ酢酸を含むアセトニトリル；

流速：1ml/分；

溶出条件：0-50%B溶液の直線濃度勾配（25分間）で溶出；

検出波長：216nm。

【0076】各ピークを分取し、マススペクトルの解析（プラットフォーム（マイクロマス社製）を使用）、およびアミノ酸組成分析（L-8500（日立製作所（株）

Arg-Ser-Gly-Ala-Ser-Ile-Leu-Gln-Ala-Gly-Cys（配列表の配列番号17）

に相当し、アミノ酸組成も一致することが明らかとなった。また、このピーク以外にはAla-KDRF (Lys<sup>26</sup>)

で4回目の溶出液）を中心にして、分子量約55kDaのバンドが検出された。この約55kDaのバンド中に存在するタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析するために、13番目の分画の残り全量をTCA沈澱処理により濃縮してから、上記と同様にして8% SDS-PAGEを行い、泳動後、ゲル内のタンパク質を以下に記載する条件でポリビニリデン・ジフルオリド（以下「PVDF」という）膜（（株）パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製）に転写した：  
転写緩衝液組成：25mM トリス、192mM グリシン、20% メタノール；  
転写装置：KS-8543（マリソル社製）；  
通電条件：19V 定電圧；  
温度：4℃；  
時間：2.5時間。

【0073】転写終了後のPVDF膜を0.2% ナフトールブルーブラック（シグマ社製）で染色し、約55kDaのバンド部分を切り取り、気相プロテインシーケンサー（PPSQ-10：島津製作所（株）社製）でN末端アミノ酸配列を解析した結果、

「DTT」という）を20 $\mu$ l、500mM 水酸化ホウ素ナトリウム 4 $\mu$ lを加え、37℃で2時間保温した。次に、0.1N 水酸化ナトリウム溶液で調整したモノヨード酢酸を終濃度17mMとなるように加え、37℃で30分保温した。100 $\mu$ lの250mM DTTを加えて反応を停止させた後、TCA沈澱を行った。風乾後の沈澱を8M 尿素を含む50mM トリス-塩酸（pH9.0）100 $\mu$ lに溶解した。このうち80 $\mu$ lを等量の50mM トリス-塩酸緩衝液（pH9.0）に加えた後、0.6 $\mu$ gのリシルエンドペプチダーゼ（和光純薬（株）社製）を加えて、37℃で18時間保温した。20 $\mu$ lの1% トリフロロ酢酸を加えてペプチダーゼ反応を停止させた後、この反応液を、以下に記載する条件の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分画した。

【0075】

社製）を使用）を行なった。その結果、保持時間12.2分に溶出されるピークがAla-KDRF (Lys<sup>26</sup>) のC末端のアミノ酸配列：

のC末端のリシルエンドペプチダーゼ断片のアミノ酸配列に相当する分子量のものが検出されなかったことか

ら、Ala-KDRF (Lys<sup>26</sup>) のC末端にはセレノシステインは取り込まれていないことが確認された。

【0077】また、このようにして得られたセレノシステインを含まないAla-KDRF (Lys<sup>26</sup>) について、文献記載の方法 [Koshi, R., et al (1997) J. Biol. Chem. 272, 2570-2574 (参照)] で5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)の還元活性を測定した結果、セレノシステインを含まないAla-KDRF (Lys<sup>26</sup>) は公知の還元酵素活性を有していることが確認された [前出Kois

5'- GCTCTGGGGC AAGCATCCTC CAGGCTGGCT GCTGAGGTTA ACCTCGAGTC TAGA -3'

(#9: 配列表の配列番号18);

5'- TCTAGACTCG AGGTTAACCT CAGCAGCCAG CCTGGAGGAT GCTTGCCCCA GAGC -3'

(#10: 配列表の配列番号19);

5'- GGTTAACATC GGTTGCAGGT CTGCACCAAT CTTAACCTAA TGGCGCCTCG AGTC -3'

(#11: 配列表の配列番号20);

5'- GACTCGAGGC GCCATTAGGT TAAGATTGGT GCAGACCTGC AACCGATGTT AACC -3'

(#12: 配列表の配列番号21)

を合成した。

【0079】次に、#9および#10各7μgを混合し、7mM トリス塩酸(pH7.5)、0.1mM EDTA、20mM 塩化ナトリウム、7mM 塩化マグネシウムを含む緩衝液中、70℃で5分間保温後、室温に戻すことにより2本鎖を形成させた。このものに、30μlの滅菌水、cDNAクローニングシステム(λgt10アダプター法用: アマシャム社製)に添付されているリガーゼ/キナーゼ緩衝液 5μl、およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡(株)社製)を10単位加え、37℃で30分間保温することにより、DNAの末端をリン酸化した。

【0080】一方、pUCKM31-7 DNA 5μgを制限酵素Aor51HIで消化後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、さらに脱リン酸化を行った。脱リン酸化の後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。このAor51HI消化したpUCKM31-7と、上記#9と#10からなる2本鎖DNAとを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌DH10B株(ギブコ・ビーアールエル社製)を形質転換した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドをXbaIで消化したときに0.12kbpの断片を生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpUCKM31-7fdh1-2-1を得た。

【0081】次に、#11と#12(各7μg)を用いて上記と同様の方法で2本鎖を形成させ、制限酵素XhoIで消化した後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。さらにこの沈殿をHpaIで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

【0082】さらに、pUCKM31-7fdh1-2-1 DNA 5μgを制限酵素XhoI、およびHpaI

hi, et al 参照]。

【0078】実施例1. fdhシグナルを用いるセレノシステイン含有KDRFの製造法。

(1-1) セレノシステイン導入ベクターの構築  
配列表の配列番号2に示されるヌクレオチド配列を含む組換えベクター pN1a31-7Kfdh-9を、以下に記載する方法に従って構築した。まず、以下に示すオリゴヌクレオチド:

aIで消化した後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ってから脱リン酸化した。脱リン酸化反応後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。このXhoIおよびHpaI消化したpUCKM31-7fdh1-2-1と、XhoIおよびHpaI消化した#11と#12からなる2本鎖DNAとを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌DH10B株を形質転換した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドをAor51HIおよびXbaIで消化したときに0.12kbpおよび88bpの断片を生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpUCKM31-7fdh1-2-1-31を得た。

【0083】次いで、pUCKM31-7fdh1-2-1-31 DNA 10μgを制限酵素XbaIで消化後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。沈殿したDNAを制限酵素SmaIで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、8%ポリアクリルアミド電気泳動を行い、約980bpのDNAを切り出した。

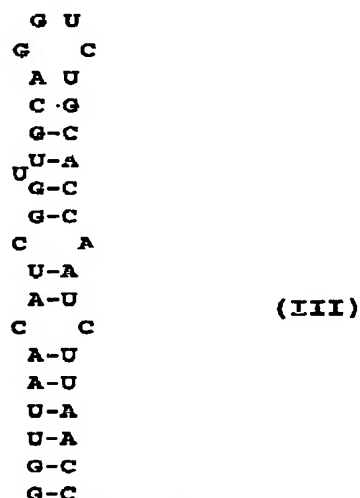
【0084】一方、参考例の(2)で調製したpN1a31-7K DNA 5μgをXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。沈殿したDNAをSmaIで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、脱リン酸化を行った。

【0085】XbaIとSmaIで消化したpN1a31-7Kと、上記の約980bpのXbaI消化DNA断片とをDNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドHpaIで消化したときに約1.7kbpの断片を生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpN1a

31-7Kfdh-9を得た(図3)。pN1a31-7Kfdh-9は、クローバーイエローベインウイルスプロテアーゼとN末端の25残基を欠失したKDRF(配列表の配列番号7のアミノ酸番号26~528に示されるアミノ酸配列)との融合タンパク質をコードするDNAの3'末端にfdhシグナルが付加されたDNA(配列表の配列番号2)を含む。該DNAから転写されたmRNAのコーディング領域の3'末端部分は、下記式(III)に示されるようなステムループ型の二次構造を形成することにより、ステムループ基部のUGA配列をセレノシステインコドンとして機能せしめると推測される:

【0086】

【化5】



5'-GGCUGCUGA-UAAUGGCGC-3'

カラム: DEAEセファロース・ファストフロー(ファルマシア社製)をXK16/20(φ2.0×20cm、ファルマシア社製)に10ml充填;

溶離緩衝液: A) 10mM トリシュー塩酸(pH7.26)、1mM DTT

B) 10mM トリシュー塩酸(pH7.26)、1mM DTT、

0.4M 塩化ナトリウム;

流速: 1ml/分;

溶出条件: 以下の順序で溶出した:

10% B液 10mlで3回溶出、

15% B液 10mlで3回溶出、

20% B液 10mlで6回溶出、

25% B液 10mlで6回溶出、

50% B液 10mlで3回溶出、

75% B液 10mlで3回溶出、

100% B液(B液のみ) 10mlで3回溶出;

フラクション: 10ml/チューブ。

【0088】得られた溶出液のうち、2、5、8、10、12、14、16、18、20、23および26番目の分画から30μlずつ採取して、それぞれTCA沈殿を行なってから、参考例の(3)と同様の条件でSDS-PAGEを行なった。泳動終了後のゲルを銀染色し

【0087】(1-2) 発現および精製

上記(1-1)で得られたpN1a31-7Kfdh-9を保持する形質転換大腸菌株を、50μg/mlのアンピシリンを含む3mlのLB培地中で、37℃で一晩培養した。この培養液を、50μg/mlのアンピシリンおよび1μMの亜セレン酸ナトリウムを含むLB培地100mlを入れた三角フラスコ3本にそれぞれ1ml加え、培養液の600nmの吸光度が0.9になるまで37℃で振盪培養してから、IPTGを最終濃度1mMになるように添加し、28℃で二晩振盪培養した。この培養液(フラスコ3本分)を4℃、7000rpmで20分間遠心してから上清を捨て、沈殿した菌体を1mM DTTを含む10mM トリシュー塩酸(pH7.26)30ml中に懸濁した。この懸濁液中の菌体を、超音波破碎機を用いて参考例の(3)と同様の条件で破碎した後、4℃、7000rpmで20分間遠心し、上清を回収した。この上清中の成分を、FPLCシステムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを以下の条件により実施することにより分画した:

た結果、14、16、18、20および23番目の分画に分子量約55kDaのバンドが検出された。そこで、14~23番目の分画を全量まとめて、1mM DTTを含む10mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.26)2リットルに対して透析した(4℃、一晩)。次いで、



KDRFがアデノシン二リン酸(ADP)に親和性を有することを利用して、FPLCシステムを用い、下記の条件でアフィニティークロマトグラフィーを実施するこ

カラム: 2' 5' ADPセファロース4B(ファルマシア社製)をXK 16/20に10ml充填;

溶離緩衝液: A) 10mM トリス-塩酸(pH7.26)、1mM DTT

B) 1.0mM トリス-塩酸(pH7.26)、1mM DTT、1M 塩化ナトリウム;

流速: 1ml/分;

溶出条件: 以下の順序で溶出した:

20% B液 10mlで5回溶出、

30% B液 10mlで5回溶出、

50% B液 10mlで5回溶出、

100% B液(B液のみ) 10mlで5回溶出;

フラクション: 10ml/チューブ。

【0089】偶数番目の分画からそれぞれ100μlずつ採取して、それぞれそれぞれTCA沈殿を行なってから、参考例の(3)と同様の条件でSDS-PAGEを行ない、ゲルを銀染色した結果、14番目の分画を中心にして、分子量約55kDaのバンドが検出された。

【0090】(1-3) N末端アミノ酸配列の確認  
上記(1-2)で実施したアフィニティークロマトグラフィーの14番目の分画からタンパク質量にして2.5

Ala-Lys-Leu-Leu-Lys-Met-Asn-Gly-Pro-Glu (配列表の配列番号16)

であったので、Ala-KDRF(Lys<sup>26</sup>)であることが確認された。

【0092】(1-4) セレノシステイン取り込みの確認

上記(1-2)で実施したアフィニティークロマトグラフィーの14番目の分画からタンパク質量2.4μg相当分を取り、TCA沈殿処理により濃縮してから、還元条件下で8%ゲルを用いたSDS-PAGEを実施した。泳動後のゲルをクイック-CBBキット(和光純薬(株)社製)により染色し、検出された約55kDaに相当するのバンド部分のゲル片を切り取り、ポリプロピレン製試験管に入れ、300μlの50%アセトニトリルを含有する0.2M 重炭酸アンモニウムを加えて30℃で30分振盪洗浄した。上清を除去してから、同じ操作をさらに2回繰り返した後、文献記載の方法[Shevchenko, A., et al (1996) Anal. Chem. 68, 850-858]に準じて、還元アルキル化、消化および抽出を行った。具体的には、まず洗浄後のゲル片に100μlのアセトニトリルを加え、ゲルを脱水、収縮させ、上清を捨てた後、遠心エバポレーターを用いて乾燥させた。次いで10mM DTTを含む100mM 重炭酸アンモニウム溶液 300μlを加えて56℃にて1時間保温した。このものを室温まで冷却した後、溶液を除去し、55mM ヨードアセトアミドを含む100mM 重炭酸アンモニウム溶液を300μl加え、時々攪拌しながら室温にて45分間インキュベートした。溶液を取り除い

とにより、透析チューブ内液から約55kDaのタンパク質を精製した;

μg相当分を取り、TCA沈殿により濃縮してから、8% SDS-PAGEを行い、泳動後、ゲル内のタンパク質を参考例の(3)と同じ条件でPVDF膜に転写した。

【0091】転写終了後のPVDF膜を0.2% ナフトールブルーブラックで染色し、約55kDaのバンド部分を切り取り、気相プロテインシーケンサーでN末端アミノ酸配列を解析した結果、

た後、ゲル片に300μlの100mM 重炭酸アンモニウムを加えて10分間洗浄した。洗浄液を除去後、200μlのアセトニトリルを加えてゲル片を脱水した。脱水後のゲル片に再度300μlの100mM 重炭酸アンモニウムを加えて再膨潤させ、その後再びアセトニトリルを加えて脱水した後、遠心エバポレーターを用いて乾燥させた。乾燥したゲル片にエンドプロテイナーゼ反応溶液(50mM 重炭酸アンモニウム、5mM 塩化カルシウム)に溶解した50μg/mlのエンドプロテイナーゼC(シーケンズグレード、ベーリンガー・マンハイム社製)溶液 20μlを加え、再膨潤させた(4℃、45分間)後、ゲルに吸収されなかった余分な酵素溶液を除去し、さらに乾燥を防ぐ目的で酵素を含まないエンドプロテイナーゼ反応溶液を少量加え、37℃にて一晩インキュベートした。なお、エンドプロテイナーゼ反応溶液の調製には、酵素-18安定同位体(<sup>18</sup>O)を50%含む水(H<sub>2</sub><sup>18</sup>O(97atom%<sup>18</sup>O:アイソテック社製)を用いて調製した:以下「50%<sup>18</sup>O水」という)を用いた。

【0093】エンドプロテイナーゼ反応終了後、ゲル片を300μlの20mM 重炭酸アンモニウムで1回、5% ギ酸を含む50% アセトニトリルで3回、それぞれ室温にて抽出し、抽出液をまとめて遠心エバポレーターで100μlまで濃縮した。

【0094】得られた濃縮抽出液のうち20μlについて、LC/ESI-MS(マイクロマス・マンチェスタ

一社製)を用いてマスマス解析を以下に記載する 条件で実施した:

カラム: LC/ESI-MS (クアトロII: マイクロマス社製);

溶離緩衝液: A) 0.09% トリフロロ酢酸を含む水

B) 0.075% トリフロロ酢酸を含むアセトニトリル;

流速: 50  $\mu$ l/分;

溶出条件: 5% Bで5分間溶出した後、60分後に60% Bとなるように、

直線濃度勾配で溶出した。

【0095】50%  $^{18}\text{O}$ 水中でエンドプロテイナーゼ-Cにより消化され生成したペプチド断片が順次溶出されマスマス解析が検出される。エンドプロテイナーゼ-C消化によって新たにC末端カルボキシル基を生成したペプチド断片は、全て約50%の $^{18}\text{O}$ をそのカルボキシル基に含むので、特徴ある2質量単位間隔のピークが検出され、消化前のC末端を含むペプチドでないことが判別できる。これに対し、保持時間23.8分に溶出した $m/z$  693に二価イオン ( $[M+2H]^{2+}$ ) が検出されるペプチド断片は、 $^{18}\text{O}$ を50%含むことによる2

Arg-Ser-Gly-Ala-Ser-Ile-Leu-Gln-Ala-Gly-Cys-Xaa-Gly

(Xaa はセレノシステインを表す: 配列表の配列番号22)

から予測される $m/z$ 値に観測値が一致したことから、C末端にセレノシステインが導入されていることが確認された。

【0096】実施例2. f d n Gシグナルを用いるセレノシステイン含有K D R Fの製造法

5'-AACACGGTA GCAAGTCTTG CTCCAACATT TGTTAGACCT GCACGCTC -3'

(#13: 配列表の配列番号23);

5'-CTGAGAGCG CTGCAGTCT ACAAATGTT GGAGCAAGAC TTGCTACCGT TGTT-3'

(#14: 配列表の配列番号24)

を合成した。#13および#14は、互いに相補的なオリゴヌクレオチドである。

【0097】#13および#14 各7  $\mu$ gを混合し、7mM トリス-塩酸(pH7.5)、0.1mM EDTA、20mM 塩化ナトリウム、7mM 塩化マグネシウムを含む緩衝液中、70℃で5分間保温後、室温に戻すことにより二本鎖を形成させた。次いで、実施例1の(1-1)記載の方法で末端をリン酸化してから、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

【0098】一方、実施例1で調製されたpUCKM31-7 f d h 1-2-1 DNA 5  $\mu$ gをXho I、およびHpa Iで消化した後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ってから脱リン酸化した。脱リン酸化反応後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

【0099】このXho IおよびHpa I消化したpUCKM31-7 f d h 1-2-1と、末端をリン酸化した#11と#12からなる二本鎖DNAとを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドをAor 51HIで消化したとき

質量単位間隔のピーク分布を示さなかったため、消化前のC末端を含むペプチド断片であることが判明した。このペプチド断片は、 $^{18}\text{O}$ 由来のピーク分布を示さない代わりに、セレンの安定同位体 ( $^{74}\text{Se}$ 、 $^{76}\text{Se}$ 、 $^{77}\text{Se}$ 、 $^{78}\text{Se}$ 、 $^{80}\text{Se}$ 、 $^{82}\text{Se}$ ) に由来する分裂したピーク分布を示し、セレノシステインがC末端に導入されたAla-K D R F (Lys<sup>26</sup>) をエンドプロテイナーゼ-C消化することにより生成することが推定されるペプチド断片:

(2-1) セレノシステイン導入ベクターの構築

配列表の配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含む組換えベクター pN I a 31-7K f d n G-7を、以下に記載する方法に従って構築した。まず以下に示すオリゴヌクレオチド:

に84bpの断片を生成する単クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミド pUCKM31-7 f d n G-3を得た。

【0100】次いで、pUCKM31-7 f d n G-3 DNA 10  $\mu$ gを制限酵素Xba Iで消化後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。沈殿したDNAを制限酵素Sma Iで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、8%ポリアクリルアミド電気泳動を行い、約980bpのDNA断片を切り出した。

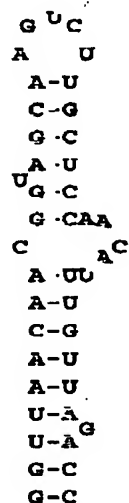
【0101】一方、参考例1で調製されたプラスミド pN I a 31-7K DNA 5  $\mu$ gをXba Iで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。沈殿したDNAをさらにSma Iで消化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、脱リン酸化を行った。

【0102】Xba IとSma Iで消化したpN I a 31-7Kと、上記のXba IとSma Iで消化した約980bpのDNA断片とを、DNAライゲーションキットを用いて連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換株の中から、それが保持するプラスミドHpa Iで消化したときに約1.7kbの断片

を生成する単一クローンを選択し、該クローンが保持するプラスミドpN1a31-7KfdnG-7を得た(図4)。pN1a31-7KfdnG-7は、クローバリーエローベインウイルスプロテアーゼとN末端の25残基を欠失したKDRFとの融合タンパク質をコードするDNAの3'末端にfdnGシグナルが付加されたDNA(配列表の配列番号3)を含む。該DNAから転写されたmRNAのコーディング領域の3'末端部分は、下記式(IV)に示されるようなステムループ型の二次構造を形成することにより、ステムループ基部のUGA配列をセレノシステインコドンとして機能せしめると推測される:

【0103】

【化6】



(IV)

5' - GGCUGCUGA-UGCAGCG -3'

## 【0104】(2-2) 発現および精製

上記(2-1)で得られたpN1a31-7KfdnG-7を保持する形質転換大腸菌株を、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む3mlのLB培地中で、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。この培養液1mlを、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンおよび1 $\mu$ Mの亜セレン酸ナトリウムを含むLB培地100mlを入れた三角フラスコに加え、培養液の600nmの吸光度が0.9になるまで37 $^{\circ}$ Cで振盪培養してから、IPTGを最終濃度1mMとなるように添加し、28 $^{\circ}$ Cで二晩振盪培養した。この培養液を4 $^{\circ}$ C、7000rpmで20分間遠心してから上清を捨て、沈澱した菌体を1mM DTTを含む10mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.26)10ml中に懸濁した。この懸濁液中の菌体を超音波破碎機で破碎した後、4 $^{\circ}$ C、7000rpmで20分間遠心し、上清を回収した。この上清中の成分を、FPLCシステムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを以下の条件で実施することにより分画した:

カラム: DEAEセファロース・ファストフロー(ファルマシア社製)をXK 16/20( $\phi$ 2.0 $\times$ 20cm:ファルマシア社製)に10ml充填;

溶離緩衝液: A) 10mM トリス-塩酸(pH7.26)、1mM DTT  
B) 10mM トリス-塩酸(pH7.26)、1mM DTT、  
0.4M 塩化ナトリウム;

流速: 1ml/分;

溶出条件: 以下の順序で溶出した:

10% B液 10mlで3回溶出、  
15% B液 10mlで3回溶出、  
20% B液 10mlで6回溶出、  
25% B液 10mlで6回溶出、  
50% B液 10mlで3回溶出、  
75% B液 10mlで3回溶出、  
100% B液(B液のみ) 10mlで3回溶出;

フラクション: 10ml/チューブ。

【0105】得られた溶出液のうち、2、5、8、10、12、14、16、18、20、23および26番目の分画から200 $\mu$ lずつ採取して、それぞれTCA沈殿処理し、還元条件下で8%ゲルを用いたSDS-P

AGEに供した(室温、20mA、90分間)。泳動終了後のゲルを銀染色した結果、14、16、18、20および23番目の分画に分子量約55kDaのバンドが検出された。13~22番目の分画を全量まとめて、1

mM DTTを含む10mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.26) 2リットルに対して透析した(4℃、一晩)。次いで、FPLCシステムを用い、下記の条件でアフィニティークロマトグラフィーを実施することによ

り、透析チューブ内液から約55kDaのタンパク質を精製した。

【0106】

カラム: 2' 5' ADPセファロース4BをXK 16/20に10ml充填;

溶離緩衝液: A) 10mM トリス-塩酸(pH 7.26)、1mM DTT

B) 10mM トリス-塩酸(pH 7.26)、1mM DTT、  
1M 塩化ナトリウム;

流速: 1ml/分

溶出条件: 以下の順序で溶出した:

20% B液 10mlで5回溶出、

30% B液 10mlで5回溶出、

50% B液 10mlで5回溶出、

100% B液(B液のみ) 10mlで5回溶出;

フラクション: 10ml/チューブ。

【0107】偶数番目の分画からそれぞれ300μlずつ採取して、それぞれTCA沈殿処理し、還元条件下で8%ゲルを用いたSDS-PAGEを行なった(室温、20mA、90分間)。泳動終了後のゲルを銀染色した結果、14番目の分画を中心にして、分子量約55kDaのバンドが検出された。

【0108】試験例。チオレドキシン還元活性。チオレドキシン還元活性の測定は大腸菌由来のチオレドキシンおよびヒト由来のチオレドキシンを用いて、文献記載の方法[Holmgren, A., et al (1977) J. Biol. Chem. 252, 4600-4606参照]に従って行った。

【0109】(1) 大腸菌由来チオレドキシンに対する還元活性

実施例1のアフィニティークロマトグラフィーの溶出分画それぞれ100μlに対して、0.5mM EDTAを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5) 1.84ml、12mM 還元型ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチドリ酸(以下「NADPH」という: ベーリンガー・マンハイム社製) 20μl、8.7mM インシュリン(ウシ由来: シグマ社製) 20μlおよび1mMの大腸菌由来チオレドキシン(プロメガ社製) 20μlを混合したものを加え、340nmの吸光度を3分間室温で測定した。測定開始時の吸光度から3分後の吸光度を差し引いた値(以下「Δ340nm」という)を算出し、そのタンパク質1mg、1分間あたりの値をチオレドキシン還元活性を示す値とした。

【0110】その結果、各試料のチオレドキシン還元活性は表1に示す通りであった。

【0111】

【表1】

分画	チオレドキシン還元活性 (Δ340nm /分/mgタンパク質)
12	3.8
14	11.4
16	11.4

次に、実施例2のアフィニティークロマトグラフィーの溶出分画それぞれ200μlに対して、0.5mM EDTAを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5) 1.74ml、12mM NADPH 20μl、8.7mM インシュリン 20μlおよび1mMの大腸菌由来チオレドキシン 20μlを混合したものを加え、340nmの吸光度を3分間室温で測定した。

【0112】その結果、各試料のチオレドキシン還元活性は表2に示す通りであった。

【0113】

【表2】

分画	チオレドキシン還元活性 (Δ340nm /分/mgタンパク質)
12	1.6
14	5.2
16	10.7

なお、参考例で調製された精製Ala-KDRF(Lys<sup>26</sup>)は、チオレドキシン還元活性を示さなかった。

【0114】(2) ヒト由来チオレドキシンに対する還元活性

実施例1の(1-5)で得られたアフィニティークロマトグラフィーの14番目の溶出分画 100μlに対して、0.5mM EDTAを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5) 1.84ml、12mM

NADPH (ベーリンガー・マンハイム社製) 20  $\mu$ l、8.7mM インシュリン (ウシ由来: シグマ社製) 20  $\mu$ l および 0.5mM のヒト由来チオレドキシン (アメリカン・ダイアグノスティカ社製) 20  $\mu$ l を混合したものを加え、340nm の吸光度を3分間室温で測定した。

【0115】その結果、測定3分間における活性 ( $\Delta$ 340nm/分/mgタンパク質) はフラクションNo. 14で8.1であった。また、セレノシステインが取り込まれていないAla-KDRF (Lys<sup>26</sup>) を用いた場合、活性はまったく検出されなかった。

#### 【0116】製剤例

本発明のチオレドキシン還元活性を有するタンパク質は、水またはそれ以外の薬理学的に許容し得る溶液に溶解した無菌性溶液または懸濁液のアンプルとして使用に供される。また、無菌粉末製剤 (チオレドキシン還元活性を有するタンパク質を凍結乾燥するのが好ましい) をアンプルに充填しておき、使用時に薬理学的に許容し得る溶液で希釈してもよい。

#### 【0117】

【発明の効果】 本発明により、ヒト由来のタンパク質であるKDRFを、セレノシステインを含みチオレドキシン還元活性を有する組換えタンパク質として大腸菌で生産することが可能となった。本発明のチオレドキシン

還元活性を有するタンパク質は、動脈硬化症、糖尿病、虚血障害 (再かん流障害、虚血性心疾患、脳虚血、虚血性腸炎など)、浮腫、血管透過性亢進、炎症、胃粘膜障害、急性肺炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝障害、パラコート病、肺気腫、化学発癌、癌転移、成人呼吸窮迫症候群、汎発性血管内血液凝固症候群 (DIC)、白内障、未熟児網膜症、自己免疫疾患、ポルフィリー血症、溶血性疾患、地中海性貧血、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん発作、紫外線障害、放射線障害、凍傷、熱傷などの病態、疾患の予防、治療において有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 pN1a31-7Vの構築過程を表す図。

【図2】 pN1a31-7Kの構築過程を表す図。

【図3】 pN1a31-7Kfdh-9の構築過程を表す図。

【図4】 pN1a31-7KfdnG-7の構築過程を表す図。

#### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 504

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

#### 配列

Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Gly	Pro	
Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ser	Tyr			
1				5					
10					15				
Asp	Tyr	Asp	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Gly	
Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala			
			20						25
				30					
Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Gln	Tyr	Gly	Lys	
Lys	Val	Met	Val	Leu	Asp	Phe			
			35					40	
			45						
Val	Thr	Pro	Thr	Pro	Leu	Gly	Thr	Arg	
Trp	Gly	Leu	Gly	Gly	Thr	Cys			
	50					55			
		60							
Val	Asn	Val	Gly	Cys	Ile	Pro	Lys	Lys	
Leu	Met	His	Gln	Ala	Ala	Leu			
65				70					
	75					80			
Leu	Gly	Gln	Ala	Leu	Gln	Asp	Ser	Arg	
Asn	Tyr	Gly	Trp	Lys	Val	Glu			
				85					
90					95				
Glu	Thr	Val	Lys	His	Asp	Trp	Asp	Arg	

Met	Ile	Glu	Ala	Val	Glu	Asn		
			100					105
				110				
His	Ile	Gly	Ser	Leu	Asn	Trp	Gly	Tyr
Arg	Val	Ala	Leu	Arg	Glu	Lys		
		115					120	
			125					
Lys	Val	Val	Tyr	Glu	Asn	Ala	Tyr	Gly
Gln	Phe	Ile	Gly	Pro	His	Arg		
	130					135		
		140						
Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Lys	Gly	Lys
Glu	Lys	Ile	Tyr	Ser	Ala	Glu		
145					150			
	155					160		
Arg	Phe	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly	Glu	Arg
Pro	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ile	Pro		
				165				
170					175			
Gly	Asp	Lys	Glu	Tyr	Cys	Ile	Ser	Ser
Asp	Asp	Leu	Phe	Ser	Leu	Pro		
			180					185
			190					
Tyr	Cys	Pro	Gly	Lys	Thr	Leu	Val	Val
Gly	Ala	Ser	Tyr	Val	Ala	Leu		
		195					200	
		205						
Glu	Cys	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Ile
Gly	Leu	Asp	Val	Thr	Val	Met		
	210					215		
		220						
Val	Arg	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Gly	Phe
Asp	Gln	Asp	Met	Ala	Asn	Lys		
225					230			
	235					240		
Ile	Gly	Glu	His	Met	Glu	Glu	His	Gly
Ile	Lys	Phe	Ile	Arg	Gln	Phe		
				245				
250					255			
Val	Pro	Ile	Lys	Val	Glu	Gln	Ile	Glu
Ala	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Leu		
			260					265
			270					
Arg	Val	Val	Ala	Gln	Ser	Thr	Asn	Ser
Glu	Glu	Ile	Ile	Glu	Gly	Glu		
		275					280	
		285						
Tyr	Asn	Thr	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Gly
Arg	Asp	Ala	Cys	Thr	Arg	Lys		
	290					295		

		300						
Ile	Gly	Leu	Glu	Thr	Val	Gly	Val	Lys
Ile	Asn	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys		
305					310			
	315					320		
Ile	Pro	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Gln	Thr
Asn	Val	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ala		
				325				
330					335			
Ile	Gly	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Lys	Val
Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Ile		
			340					345
				350				
Gln	Ala	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Gln	Arg
Leu	Tyr	Ala	Gly	Ser	Thr	Val		
		355					360	
			365					
Lys	Cys	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val	Pro	Thr
Thr	Val	Phe	Thr	Pro	Leu	Glu		
	370					375		
		380						
Tyr	Gly	Ala	Cys	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu
Lys	Ala	Val	Glu	Lys	Phe	Gly		
385					390			
	395					400		
Glu	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	His	Ser
Tyr	Phe	Trp	Pro	Leu	Glu	Trp		
			405					
410					415			
Thr	Ile	Pro	Ser	Arg	Asp	Asn	Asn	Lys
Cys	Tyr	Ala	Lys	Ile	Ile	Cys		
			420					425
				430				
Asn	Thr	Lys	Asp	Asn	Glu	Arg	Val	Val
Gly	Phe	His	Val	Leu	Gly	Pro		
		435					440	
			445					
Asn	Ala	Gly	Glu	Val	Thr	Gln	Gly	Phe
Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Cys	Gly		
	450					455		
		460						
Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Asp	Ser	Thr
Ile	Gly	Ile	His	Pro	Val	Cys		
465					470			
	475					480		
Ala	Glu	Val	Phe	Thr	Thr	Leu	Ser	Val
Thr	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser		
				485				
490					495			
Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Cys	Xaa	Gly	

500

配列番号: 2  
 配列の長さ: 2872  
 配列の型: 核酸  
 鎖の数: 二本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: cDNA to mRNA  
 ハイボセティカル: No  
 アンチセンス: No  
 配列の特徴

特徴を表す記号: CDS  
 存在位置: 1..2817  
 特徴を決定した方法: E  
 特徴を表す記号: mat peptide  
 存在位置: 130..2817  
 特徴を決定した方法: E  
 特徴を表す記号: stem loop  
 存在位置: 2814..2852  
 特徴を決定した方法: P

## 配列

ATG GGG AAA AGT AAG AGA ACA AGA CAA AAG TTG AAG TTC AGA GCG GCA	48
Met Gly Lys Ser Lys Arg Thr Arg Gln Lys Leu Lys Phe Arg Ala Ala	
-435 -430 -425 -420	
AGA GAC ATG AAG GAT CGT TAT GAA GTG CAT GCC GAT GAG GGG ACT TTA	96
Arg Asp Met Lys Asp Arg Tyr Glu Val His Ala Asp Glu Gly Thr Leu	
-415 -410 -405	
GTG GAA AAT TTT GGA ACT CGT TAT TCA AAG AAA GGC AAG ACA AAA GGT	144
Val Glu Asn Phe Gly Thr Arg Tyr Ser Lys Lys Gly Lys Thr Lys Gly	
-400 -395 -390	
ACT GTT GTG GGT TTG GGT GCA AAA ACA AGA CGG TTC ACT AAC ATG TAT	192
Thr Val Val Gly Leu Gly Ala Lys Thr Arg Arg Phe Thr Asn Met Tyr	
-385 -380 -375	
GGT TTT GAC CCC ACG GAG TAT TCA TTT GCT AGG TAT CTT GAT CCA ATC	240
Gly Phe Asp Pro Thr Glu Tyr Ser Phe Ala Arg Tyr Leu Asp Pro Ile	
-370 -365 -360	
ACG GGT GCA ACA TTG GAT GAA ACC CCA ATT CAC AAT GTA AAT TTG GTT	288
Thr Gly Ala Thr Leu Asp Glu Thr Pro Ile His Asn Val Asn Leu Val	
-355 -350 -345 -340	
GCT GAG CAT TTT GGC GAC ATA AGG CTT GAT ATG GTT GAC AAG GAG TTA	336
Ala Glu His Phe Gly Asp Ile Arg Leu Asp Met Val Asp Lys Glu Leu	
-335 -330 -325	
CTT GAC AAA CAG CAC TTA TAC CTC AAG AGA CCA ATA GAA TGT TAC TTT	384
Leu Asp Lys Gln His Leu Tyr Leu Lys Arg Pro Ile Glu Cys Tyr Phe	
-320 -315 -310	
GTA AAG GAT GCT GGT CAG AAG GTG ATG AGG ATT GAT CTA ACA CCC CAC	432
Val Lys Asp Ala Gly Gln Lys Val Met Arg Ile Asp Leu Thr Pro His	
-305 -300 -295	
AAC CCA TTG TTG GCA AGC GAT GTT AGC ACA ACC ATA ATG GGT TAT CCT	480
Asn Pro Leu Leu Ala Ser Asp Val Ser Thr Thr Ile Met Gly Tyr Pro	
-290 -285 -280	
GAG AGA GAA GGT GAA CTC CGT CAA ACT GGA AAG GCA AGG TTA GTC GAC	528
Glu Arg Glu Gly Glu Leu Arg Gln Thr Gly Lys Ala Arg Leu Val Asp	
-275 -270 -265 -260	
CCA TCA GAG TTG CCC GCG AAT GAG GAT ATT GAT GCA GAG TTT GAG	576
Pro Ser Glu Leu Pro Ala Arg Asn Glu Asp Ile Asp Ala Glu Phe Glu	
-255 -250 -245	
AGT CTA AAT CGC ATA AGT GGT TTG CGC GAC TAT AAT CCC ATT TCA CAA	624
Ser Leu Asn Arg Ile Ser Gly Leu Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Gln	
-240 -235 -230	



AAT GTT TGC TTG CTA ACA AAT GAG TCA GAA GGC CAT AGA GAG AAG ATG	672
Asn Val Cys Leu Leu Thr Asn Glu Ser Glu Gly His Arg Glu Lys Met	
-225 -220 -215	
TTT GGA ATT GGA TAT GGT TCA GTG ATC ATT ACA AAT CAA CAT CTG TTC	720
Phe Gly Ile Gly Tyr Gly Ser Val Ile Ile Thr Asn Gln His Leu Phe	
-210 -205 -200	
AGA AGG AAT AAT GGG GAG TTA TCA ATT CAA TCC AAG CAT GGC TAC TTC	768
Arg Arg Asn Asn Gly Glu Leu Ser Ile Gln Ser Lys His Gly Tyr Phe	
-195 -190 -185 -180	
AGA TGC CGC AAC ACC ACA AGC TTG AAG ATG CTG CCT TTG GAG GGA CAT	816
Arg Cys Arg Asn Thr Thr Ser Leu Lys Met Leu Pro Leu Glu Gly His	
-175 -170 -165	
GAC ATT TTG TTG ATT CAG TTA CCA AGG GAC TTT CCA GTG TTT CCA CAA	864
Asp Ile Leu Leu Ile Gln Leu Pro Arg Asp Phe Pro Val Phe Pro Gln	
-160 -155 -150	
AAG ATT CGC TTT AGG GAG CCA AGA GTG GAT GAC AAA ATT GTT TTG GTC	912
Lys Ile Arg Phe Arg Glu Pro Arg Val Asp Asp Lys Ile Val Leu Val	
-145 -140 -135	
AGC ACA AAT TTC CAG GAA AAG AGT TCC TCG AGC ACG GTC TCA GAG TCC	960
Ser Thr Asn Phe Gln Glu Lys Ser Ser Ser Ser Thr Val Ser Glu Ser	
-130 -125 -120	
AGT AAC ATT TCA AGA GTG CAG TCA GCC AAT TTC TAC AAG CAT TGG ATC	1008
Ser Asn Ile Ser Arg Val Gln Ser Ala Asn Phe Tyr Lys His Trp Ile	
-115 -110 -105 -100	
TCA ACA GTA GCA GGA CAC TGT GGA AAC CCT ATG GTT TCG ACT AAA GAT	1056
Ser Thr Val Ala Gly His Cys Gly Asn Pro Met Val Ser Thr Lys Asp	
-95 -90 -85	
GGA TTT ATT GTA GGT ATC CAC AGT CTT GCT TCA TTG ACA GGC GAC GTT	1104
Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Leu Ala Ser Leu Thr Gly Asp Val	
-80 -75 -70	
AAC ATC TTC ACA AGC TTT CCG CCG CAG TTT GAG AAC AAA TAT CTA CAG	1152
Asn Ile Phe Thr Ser Phe Pro Pro Gln Phe Glu Asn Lys Tyr Leu Gln	
-65 -60 -55	
AAG CTC AGT GAA CAC ACA TGG TGT AGT GGA TGG AAA CTA AAT CTT GGA	1200
Lys Leu Ser Glu His Thr Trp Cys Ser Gly Trp Lys Leu Asn Leu Gly	
-50 -45 -40	
AAG ATT AGT TGG GGT GGA ATC AAC ATT GTG GAG GAT GCA CCT GAA GAG	1248
Lys Ile Ser Trp Gly Gly Ile Asn Ile Val Glu Asp Ala Pro Glu Glu	
-35 -30 -25 -20	
CCC TTT ATA ACA TCC AAG ATG GCA AGC CTT CTT AGT GAT TTG AAT TGT	1296
Pro Phe Ile Thr Ser Lys Met Ala Ser Leu Leu Ser Asp Leu Asn Cys	
-15 -10 -5	
TCA TTC CAA GCA AAG CTA CTA AAA ATG AAC GGC CCT GAA GAT CTT CCC	1344
Ser Phe Gln Ala Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu Asp Leu Pro	
1 5 10	
AAG TCC TAT GAC TAT GAC CTT ATC ATC ATT GGA GGT GGC TCA GGA GGT	1392
Lys Ser Tyr Asp Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
15 20 25	
CTG GCA GCT GCT AAG GAG GCA GCC CAA TAT GGC AAG AAG GTG ATG GTC	1440
Leu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val	

30	35	40	45	
CTG GAC TTT GTC ACT CCC ACC CCT CTT GGA ACT AGA TGG GGT CTT GGA				1488
Leu Asp Phe Val Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly				
	50	55	60	
GGA ACA TGT GTG AAT GTG GGT TGC ATA CCT AAA AAA CTG ATG CAT CAA				1536
Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln				
	65	70	75	
GCA GCT TTG TTA GGA CAA GCC CTG CAA GAC TCT CGA AAT TAT GGA TGG				1584
Ala Ala Leu Leu Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp				
	80	85	90	
AAA GTC GAG GAG ACA GTT AAG CAT GAT TGG GAC AGA ATG ATA GAA GCT				1632
Lys Val Glu Glu Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala				
	95	100	105	
GTA CAG AAT CAC ATT GGC TCT TTG AAT TGG GGC TAC CGA GTA GCT CTG				1680
Val Gln Asn His Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu				
110	115	120	125	
CGG GAG AAA AAA GTC GTC TAT GAG AAT GCT TAT GGG CAA TTT ATT GGT				1728
Arg Glu Lys Lys Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly				
	130	135	140	
CCT CAC AGG ATT AAG GCA ACA AAT AAT AAA GGC AAA GAA AAA ATT TAT				1776
Pro His Arg Ile Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr				
	145	150	155	
TCA GCA GAG AGA TTT CTC ATT GCC ACT GGT GAA AGA CCA CGT TAC TTG				1824
Ser Ala Glu Arg Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu				
	160	165	170	
GGC ATC CCT GGT GAC AAA GAA TAC TGC ATC AGC AGT GAT GAT CTT TTC				1872
Gly Ile Pro Gly Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe				
	175	180	185	
TCC TTG CCT TAC TGC CCG GGT AAG ACC CTG GTT GTT GGA GCA TCC TAT				1920
Ser Leu Pro Tyr Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr				
190	195	200	205	
GTC GCT TTG GAG TGC GCT GGA TTT CTT GCT GGT ATT GGT TTA GAC GTC				1968
Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Val				
	210	215	220	
ACT GTT ATG GTT AGG TCC ATT CTT CTT AGA GGA TTT GAC CAG GAC ATG				2016
Thr Val Met Val Arg Ser Ile Leu Leu Arg Gly Phe Asp Gln Asp Met				
	225	230	235	
GCC AAC AAA ATT GGT GAA CAC ATG GAA GAA CAT GGC ATC AAG TTT ATA				2064
Ala Asn Lys Ile Gly Glu His Met Glu Glu His Gly Ile Lys Phe Ile				
	240	245	250	
AGA CAG TTC GTA CCA ATT AAA GTT GAA CAA ATT GAA GCA GGG ACA CCA				2112
Arg Gln Phe Val Pro Ile Lys Val Glu Gln Ile Glu Ala Gly Thr Pro				
	255	260	265	
GGC CGA CTC AGA GTA GTA GCT CAG TCC ACC AAT AGT GAG GAA ATC ATT				2160
Gly Arg Leu Arg Val Val Ala Gln Ser Thr Asn Ser Glu Glu Ile Ile				
270	275	280	285	
GAA GGA GAA TAT AAT ACG GTG ATG CTG GCA ATA GGA AGA GAT GCT TGC				2208
Glu Gly Glu Tyr Asn Thr Val Met Leu Ala Ile Gly Arg Asp Ala Cys				
	290	295	300	
ACA AGA AAA ATT GGC TTA GAA ACC GTA GGG GTG AAG ATA AAT GAA AAG				2256

```

Thr Arg Lys Ile Gly Leu Glu Thr Val Gly Val Lys Ile Asn Glu Lys
      305                      310                      315
ACT GGA AAA ATA CCT GTC ACA GAT GAA GAA CAG ACC AAT GTG CCT TAC 2304
Thr Gly Lys Ile Pro Val Thr Asp Glu Glu Gln Thr Asn Val Pro Tyr
      320                      325                      330
ATC TAT GCC ATT GGC GAT ATA TTG GAG GAT AAG GTG GAG CTC ACC CCA 2352
Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu Leu Thr Pro
      335                      340                      345
GTT GCA ATC CAG GCA GGA AGA TTG CTG GCT CAG AGG CTC TAT GCA GGT 2400
Val Ala Ile Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Gly
350                      355                      360                      365
TCC ACT GTC AAG TGT GAC TAT GAA AAT GTT CCA ACC ACT GTA TTT ACT 2448
Ser Thr Val Lys Cys Asp Tyr Glu Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr
      370                      375                      380
CCT TTG GAA TAT GGT GCT TGT GGC CTT TCT GAG GAG AAA GCT GTG GAG 2496
Pro Leu Glu Tyr Gly Ala Cys Gly Leu Ser Glu Glu Lys Ala Val Glu
      385                      390                      395
AAG TTT GGG GAA GAA AAT ATT GAG GTT TAC CAT AGT TAC TTT TGG CCA 2544
Lys Phe Gly Glu Glu Asn Ile Glu Val Tyr His Ser Tyr Phe Trp Pro
      400                      405                      410
TTG GAA TGG ACG ATT CCG TCA AGA GAT AAC AAC AAA TGT TAT GCA AAA 2592
Leu Glu Trp Thr Ile Pro Ser Arg Asp Asn Asn Lys Cys Tyr Ala Lys
      415                      420                      425
ATA ATC TGT AAT ACT AAA GAC AAT GAA CGT GTT GTG GGC TTT CAC GTA 2640
Ile Ile Cys Asn Thr Lys Asp Asn Glu Arg Val Val Gly Phe His Val
430                      435                      440                      445
CTG GGT CCA AAT GCT GGA GAA GTT ACA CAA GGC TTT GCA GCT GCG CTC 2688
Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Ala Ala Leu
      450                      455                      460
AAA TGT GGA CTG ACC AAA AAG CAG CTG GAC AGC ACA ATT GGA ATC CAC 2736
Lys Cys Gly Leu Thr Lys Lys Gln Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ile His
      465                      470                      475
CCT GTC TGT GCA GAG GTA TTC ACA ACA TTG TCT GTG ACC AAG CGC TCT 2784
Pro Val Cys Ala Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser
      480                      485                      490
GGG GCA AGC ATC CTC CAG GCT GGC TGC TGA GGT TAACATCGGT TGCAGGTCTG 2837
Gly Ala Ser Ile Leu Gln Ala Gly Cys Xaa Gly
      495                      500
CACCAATCTT AACCTAATGG CGCCTCGAGT CTAGA 2872

```

配列番号: 3

配列の長さ: 2878

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1..2817

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 1306..2817

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: stem loop

存在位置: 2814..2858

特徴を決定した方法: P

配列

```

ATG GGG AAA AGT AAG AGA ACA AGA CAA AAG TTG AAG TTC AGA GCG GCA 48

```

Met Gly Lys Ser Lys Arg Thr Arg Gln Lys Leu Lys Phe Arg Ala Ala			
-435	-430	-425	-420
AGA GAC ATG AAG GAT CGT TAT GAA GTG CAT GCC GAT GAG GGG ACT TTA	96		
Arg Asp Met Lys Asp Arg Tyr Glu Val His Ala Asp Glu Gly Thr Leu			
-415	-410	-405	
GTG GAA AAT TTT GGA ACT CGT TAT TCA AAG AAA GGC AAG ACA AAA GGT	144		
Val Glu Asn Phe Gly Thr Arg Tyr Ser Lys Lys Gly Lys Thr Lys Gly			
-400	-395	-390	
ACT GTT GTG GGT TTG GGT GCA AAA ACA AGA CGG TTC ACT AAC ATG TAT	192		
Thr Val Val Gly Leu Gly Ala Lys Thr Arg Arg Phe Thr Asn Met Tyr			
-385	-380	-375	
GGT TTT GAC CCC ACG GAG TAT TCA TTT GCT AGG TAT CTT GAT CCA ATC	240		
Gly Phe Asp Pro Thr Glu Tyr Ser Phe Ala Arg Tyr Leu Asp Pro Ile			
-370	-365	-360	
ACG GGT GCA ACA TTG GAT GAA ACC CCA ATT CAC AAT GTA AAT TTG GTT	288		
Thr Gly Ala Thr Leu Asp Glu Thr Pro Ile His Asn Val Asn Leu Val			
-355	-350	-345	-340
GCT GAG CAT TTT GGC GAC ATA AGG CTT GAT ATG GTT GAC AAG GAG TTA	336		
Ala Glu His Phe Gly Asp Ile Arg Leu Asp Met Val Asp Lys Glu Leu			
-335	-330	-325	
CTT GAC AAA CAG CAC TTA TAC CTC AAG AGA CCA ATA GAA TGT TAC TTT	384		
Leu Asp Lys Gln His Leu Tyr Leu Lys Arg Pro Ile Glu Cys Tyr Phe			
-320	-315	-310	
GTA AAG GAT GCT GGT CAG AAG GTG ATG AGG ATT GAT CTA ACA CCC CAC	432		
Val Lys Asp Ala Gly Gln Lys Val Met Arg Ile Asp Leu Thr Pro His			
-305	-300	-295	
AAC CCA TTG TTG GCA AGC GAT GTT AGC ACA ACC ATA ATG GGT TAT CCT	480		
Asn Pro Leu Leu Ala Ser Asp Val Ser Thr Thr Ile Met Gly Tyr Pro			
-290	-285	-280	
GAG AGA GAA GGT GAA CTC CGT CAA ACT GGA AAG GCA AGG TTA GTC GAC	528		
Glu Arg Glu Gly Glu Leu Arg Gln Thr Gly Lys Ala Arg Leu Val Asp			
-275	-270	-265	-260
CCA TCA GAG TTG CCC GCG CGG AAT GAG GAT ATT GAT GCA GAG TTT GAG	576		
Pro Ser Glu Leu Pro Ala Arg Asn Glu Asp Ile Asp Ala Glu Phe Glu			
-255	-250	-245	
AGT CTA AAT CGC ATA AGT GGT TTG CGC GAC TAT AAT CCC ATT TCA CAA	624		
Ser Leu Asn Arg Ile Ser Gly Leu Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Gln			
-240	-235	-230	
AAT GTT TGC TTG CTA ACA AAT GAG TCA GAA GGC CAT AGA GAG AAG ATG	672		
Asn Val Cys Leu Leu Thr Asn Glu Ser Glu Gly His Arg Glu Lys Met			
-225	-220	-215	
TTT GGA ATT GGA TAT GGT TCA GTG ATC ATT ACA AAT CAA CAT CTG TTC	720		
Phe Gly Ile Gly Tyr Gly Ser Val Ile Ile Thr Asn Gln His Leu Phe			
-210	-205	-200	
AGA AGG AAT AAT GGG GAG TTA TCA ATT CAA TCC AAG CAT GGC TAC TTC	768		
Arg Arg Asn Asn Gly Glu Leu Ser Ile Gln Ser Lys His Gly Tyr Phe			
-195	-190	-185	-180
AGA TGC CGC AAC ACC ACA AGC TTG AAG ATG CTG CCT TTG GAG GGA CAT	816		

Arg Cys Arg Asn Thr Thr Ser Leu Lys Met Leu Pro Leu Glu Gly His	
-175 -170 -165	
GAC ATT TTG T G ATT CAG TTA CCA AGG GAC TTT CCA GTG TTT CCA CAA	864
Asp Ile Leu Leu Ile Gln Leu Pro Arg Asp Phe Pro Val Phe Pro Gln	
-60 -155 -150	
AAG ATT CGC T T AGG GAG CCA AGA GTG GAT GAC AAA ATT GTT TTG GTC	912
Lys Ile Arg Phe Arg Glu Pro Arg Val Asp Asp Lys Ile Val Leu Val	
-145 -140 -135	
AGC ACA AAT TTC CAG GAA AAG AGT TCC TCG AGC ACG GTC TCA GAG TCC	960
Ser Thr Asn Phe Gln Glu Lys Ser Ser Ser Ser Thr Val Ser Glu Ser	
-130 -125 -120	
AGT AAC ATT TCA AGA GTG CAG TCA GCC AAT TTC TAC AAG CAT TGG ATC	1008
Ser Asn Ile Ser Arg Val Gln Ser Ala Asn Phe Tyr Lys His Trp Ile	
-115 -110 -105 -100	
TCA ACA GTA GCA GGA CAC TGT GGA AAC CCT ATG GTT TCG ACT AAA GAT	1056
Ser Thr Val Ala Gly His Cys Gly Asn Pro Met Val Ser Thr Lys Asp	
-95 -90 -85	
GGA TTT ATT GTA GGT ATC CAC AGT CTT GCT TCA TTG ACA GGC GAC GTT	1104
Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Leu Ala Ser Leu Thr Gly Asp Val	
-80 -75 -70	
AAC ATC TTC ACA AGC TTT CCG CCG CAG TTT GAG AAC AAA TAT CTA CAG	1152
Asn Ile Phe Thr Ser Phe Pro Pro Gln Phe Glu Asn Lys Tyr Leu Gln	
-65 -60 -55	
AAG CTC AGT GAA CAC ACA TGG TGT AGT GGA TGG AAA CTA AAT CTT GGA	1200
Lys Leu Ser Glu His Thr Trp Cys Ser Gly Trp Lys Leu Asn Leu Gly	
-50 -45 -40	
AAG ATT AGT TGG GGT GGA ATC AAC ATT GTG GAG GAT GCA CCT GAA GAG	1248
Lys Ile Ser Trp Gly Gly Ile Asn Ile Val Glu Asp Ala Pro Glu Glu	
-35 -30 -25 -20	
CCC TTT ATA ACA TCC AAG ATG GCA AGC CTT CTT AGT GAT TTG AAT TGT	1296
Pro Phe Ile Thr Ser Lys Met Ala Ser Leu Leu Ser Asp Leu Asn Cys	
-15 -10 -5	
TCA TTC CAA GCA AAG CTA CTA AAA ATG AAC GGC CCT GAA GAT CTT CCC	1344
Ser Phe Gln Ala Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu Asp Leu Pro	
1 5 10	
AAG TCC TAT GAC TAT GAC CTT ATC ATC ATT GGA GGT GGC TCA GGA GGT	1392
Lys Ser Tyr Asp Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
15 20 25	
CTG GCA GCT GCT AAG GAG GCA GCC CAA TAT GGC AAG AAG GTG ATG GTC	1440
Leu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val	
30 35 40 45	
CTG GAC TTT GTC ACT CCC ACC CCT CTT GGA ACT AGA TGG GGT CTT GGA	1488
Leu Asp Phe Val Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly	
50 55 60	
GGA ACA TGT GTG AAT GTG GGT TGC ATA CCT AAA AAA CTG ATG CAT CAA	1536
Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln	
65 70 75	
GCA GCT TTG TTA GGA CAA GCC CTG CAA GAC TCT CGA AAT TAT GGA TGG	1584
Ala Ala Leu Leu Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp	
80 85 90	

AAA GTC GAG GAG ACA GTT AAG CAT GAT TGG GAC AGA ATG ATA GAA GCT	1632
Lys Val Glu Glu Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala	
95 100 105	
GTA CAG AAT CAC ATT GGC TCT TTG AAT TGG GGC TAC CGA GTA GCT CTG	1680
Val Gln Asn His Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu	
110 115 120 125	
CGG GAG AAA AAA GTC GTC TAT GAG AAT GCT TAT GGG CAA TTT ATT GGT	1728
Arg Glu Lys Lys Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly	
130 135 140	
CCT CAC AGG ATT AAG GCA ACA AAT AAT AAA GGC AAA GAA AAA ATT TAT	1776
Pro His Arg Ile Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr	
145 150 155	
TCA GCA GAG AGA TTT CTC ATT GCC ACT GGT GAA AGA CCA CGT TAC TTG	1824
Ser Ala Glu Arg Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu	
160 165 170	
GGC ATC CCT GGT GAC AAA GAA TAC TGC ATC AGC AGT GAT GAT CTT TTC	1872
Gly Ile Pro Gly Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe	
175 180 185	
TCC TTG CCT TAC TGC CCG GGT AAG ACC CTG GTT GTT GGA GCA TCC TAT	1920
Ser Leu Pro Tyr Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr	
190 195 200 205	
GTC GCT TTG GAG TGC GCT GGA TTT CTT GCT GGT ATT GGT TTA GAC GTC	1968
Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Val	
210 215 220	
ACT GTT ATG GTT AGG TCC ATT CTT CTT AGA GGA TTT GAC CAG GAC ATG	2016
Thr Val Met Val Arg Ser Ile Leu Leu Arg Gly Phe Asp Gln Asp Met	
225 230 235	
GCC AAC AAA ATT GGT GAA CAC ATG GAA GAA CAT GGC ATC AAG TTT ATA	2064
Ala Asn Lys Ile Gly Glu His Met Glu Glu His Gly Ile Lys Phe Ile	
240 245 250	
AGA CAG TTC GTA CCA ATT AAA GTT GAA CAA ATT GAA GCA GGG ACA CCA	2112
Arg Gln Phe Val Pro Ile Lys Val Glu Gln Ile Glu Ala Gly Thr Pro	
255 260 265	
GGC CGA CTC AGA GTA GTA GCT CAG TCC ACC AAT AGT GAG GAA ATC ATT	2160
Gly Arg Leu Arg Val Val Ala Gln Ser Thr Asn Ser Glu Glu Ile Ile	
270 275 280 285	
GAA GGA GAA TAT AAT ACG GTG ATG CTG GCA ATA GGA AGA GAT GCT TGC	2208
Glu Gly Glu Tyr Asn Thr Val Met Leu Ala Ile Gly Arg Asp Ala Cys	
290 295 300	
ACA AGA AAA ATT GGC TTA GAA ACC GTA GGG GTG AAG ATA AAT GAA AAG	2256
Thr Arg Lys Ile Gly Leu Glu Thr Val Gly Val Lys Ile Asn Glu Lys	
305 310 315	
ACT GGA AAA ATA CCT GTC ACA GAT GAA GAA CAG ACC AAT GTG CCT TAC	2304
Thr Gly Lys Ile Pro Val Thr Asp Glu Glu Gln Thr Asn Val Pro Tyr	
320 325 330	
ATC TAT GCC ATT GGC GAT ATA TTG GAG GAT AAG GTG GAG CTC ACC CCA	2352
Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu Leu Thr Pro	
335 340 345	
GTT GCA ATC CAG GCA GGA AGA TTG CTG GCT CAG AGG CTC TAT GCA GGT	2400
Val Ala Ile Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Gly	

```

350          355          360          365
TCC ACT GTC AAG TGT GAC TAT GAA AAT GTT CCA ACC ACT GTA TTT ACT 2448
Ser Thr Val Lys Cys Asp Tyr Glu Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr
          370          375          380
CCT TTG GAA TAT GGT GCT TGT GGC CTT TCT GAG GAG AAA GCT GTG GAG 2496
Pro Leu Glu Tyr Gly Ala Cys Gly Leu Ser Glu Glu Lys Ala Val Glu
          385          390          395
AAG TTT GGG GAA GAA AAT ATT GAG GTT TAC CAT AGT TAC TTT TGG CCA 2544
Lys Phe Gly Glu Glu Asn Ile Glu Val Tyr His Ser Tyr Phe Trp Pro
          400          405          410
TTG GAA TGG ACG ATT CCG TCA AGA GAT AAC AAC AAA TGT TAT GCA AAA 2592
Leu Glu Trp Thr Ile Pro Ser Arg Asp Asn Asn Lys Cys Tyr Ala Lys
          415          420          425
ATA ATC TGT AAT ACT AAA GAC AAT GAA CGT GTT GTG GGC TTT CAC GTA 2640
Ile Ile Cys Asn Thr Lys Asp Asn Glu Arg Val Val Gly Phe His Val
          430          435          440          445
CTG GGT CCA AAT GCT GGA GAA GTT ACA CAA GGC TTT GCA GCT GCG CTC 2688
Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Ala Ala Leu
          450          455          460
AAA TGT GGA CTG ACC AAA AAG CAG CTG GAC AGC ACA ATT GGA ATC CAC 2736
Lys Cys Gly Leu Thr Lys Lys Gln Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ile His
          465          470          475
CCT GTC TGT GCA GAG GTA TTC ACA ACA TTG TCT GTG ACC AAG CGC TCT 2784
Pro Val Cys Ala Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser
          480          485          490
GGG GCA AGC ATC CTC CAG GCT GGC TGC TGA GGT TAACAACGGT AGCAAGTCTT 2837
Gly Ala Ser Ile Leu Gln Ala Gly Cys Xaa Gly
          495          500
GCTCCAACAT TTGTTAGACC TGCAGCGCTC TCGAGTCTAG A 2878

```

配列番号: 4

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: mRNA

ハイボセティカル: Yes

アンチセンス: No

配列

CAUCGGUUGC AGGUCUGCAC CAAUCNNNN NUD

33

配列番号: 5

配列の長さ: 39

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: mRNA

ハイボセティカル: Yes

アンチセンス: No

配列

CAACGGUAGC AAGUCUUGCU CCAACAUUG NNNNNNNUD

39

配列番号: 6

配列の長さ: 1656

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

起源

生物名: ホモ・サピエンス (Homo sapiens)

セルライン: KM-102

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1..1653

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 70..1653

特徴を決定した方法: E

## 配列

ATG TCA TGT GAG GAC GGT CGG GCC CTG GAA GGA ACG CTC TCG GAA TTG	48
Met Ser Cys Glu Asp Gly Arg Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ser Glu Leu	
-23 -20 -15 -10	
GCC GCG GAA ACC GAT CTG CCC GTT GTG TTT GTG AAA CAG AGA AAG ATA	96
Ala Ala Glu Thr Asp Leu Pro Val Val Phe Val Lys Gln Arg Lys Ile	
-5 1 5	
GGC GGC CAT GGT CCA ACC TTG AAG GCT TAT CAG GAG GGC AGA CTT CAA	144
Gly Gly His Gly Pro Thr Leu Lys Ala Tyr Gln Glu Gly Arg Leu Gln	
10 15 20 25	
AAG CTA CTA AAA ATG AAC GGC CCT GAA GAT CTT CCC AAG TCC TAT GAC	192
Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu Asp Leu Pro Lys Ser Tyr Asp	
30 35 40	
TAT GAC CTT ATC ATC ATT GGA GGT GGC TCA GGA GGT CTG GCA GCT GCT	240
Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Ala Ala	
45 50 55	
AAG GAG GCA GCC CAA TAT GGC AAG AAG GTG ATG GTC CTG GAC TTT GTC	288
Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val Leu Asp Phe Val	
60 65 70	
ACT CCC ACC CCT CTT GGA ACT AGA TGG GGT CTT GGA GGA ACA TGT GTG	336
Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val	
75 80 85	
AAT GTG GGT TGC ATA CCT AAA AAA CTG ATG CAT CAA GCA GCT TTG TTA	384
Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu	
90 95 100 105	
GGA CAA GCC CTG CAA GAC TCT CGA AAT TAT GGA TGG AAA GTC GAG GAG	432
Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp Lys Val Glu Glu	
110 115 120	
ACA GTT AAG CAT GAT TGG GAC AGA ATG ATA GAA GCT GTA CAG AAT CAC	480
Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala Val Gln Asn His	
125 130 135	
ATT GGC TCT TTG AAT TGG GGC TAC CGA GTA GCT CTG CGG GAG AAA AAA	528
Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu Arg Glu Lys Lys	
140 145 150	
GTC GTC TAT GAG AAT GCT TAT GGG CAA TTT ATT GGT CCT CAC AGG ATT	576
Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly Pro His Arg Ile	
155 160 165	
AAG GCA ACA AAT AAT AAA GGC AAA GAA AAA ATT TAT TCA GCA GAG AGA	624
Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr Ser Ala Glu Arg	
170 175 180 185	
TTT CTC ATT GCC ACT GGT GAA AGA CCA CGT TAC TTG GGC ATC CCT GGT	672
Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Gly	
190 195 200	
GAC AAA GAA TAC TGC ATC AGC AGT GAT GAT CTT TTC TCC TTG CCT TAC	720
Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe Ser Leu Pro Tyr	
205 210 215	
TGC CCG GGT AAG ACC CTG GTT GTT GGA GCA TCC TAT GTC GCT TTG GAG	768
Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu	
220 225 230	
TGC GCT GGA TTT CTT GCT GGT ATT GGT TTA GAC GTC ACT GTT ATG GTT	816



Cys	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Leu	Asp	Val	Thr	Val	Met	Val	
235						240				245						
AGG	TCC	ATT	CTT	CTT	AGA	GGA	TTT	GAC	CAG	GAC	ATG	GCC	AAC	AAA	ATT	864
Arg	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Gly	Phe	Asp	Gln	Asp	Met	Ala	Asn	Lys	Ile	
250					255				260					265		
GGT	GAA	CAC	ATG	GAA	GAA	CAT	GGC	ATC	AAG	TTT	ATA	AGA	CAG	TTC	GTA	912
Gly	Glu	His	Met	Glu	Glu	His	Gly	Ile	Lys	Phe	Ile	Arg	Gln	Phe	Val	
				270				275					280			
CCA	ATT	AAA	GTT	GAA	CAA	ATT	GAA	GCA	GGG	ACA	CCA	GGC	CGA	CTC	AGA	960
Pro	Ile	Lys	Val	Glu	Gln	Ile	Glu	Ala	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Leu	Arg	
				285				290					295			
GTA	GTA	GCT	CAG	TCC	ACC	AAT	AGT	GAG	GAA	ATC	ATT	GAA	GGA	GAA	TAT	1008
Val	Val	Ala	Gln	Ser	Thr	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu	Gly	Glu	Tyr	
				300				305					310			
AAT	ACG	GTG	ATG	CTG	GCA	ATA	GGA	AGA	GAT	GCT	TGC	ACA	AGA	AAA	ATT	1056
Asn	Thr	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Gly	Arg	Asp	Ala	Cys	Thr	Arg	Lys	Ile	
				315				320					325			
GGC	TTA	GAA	ACC	GTA	GGG	GTG	AAG	ATA	AAT	GAA	AAG	ACT	GGA	AAA	ATA	1104
Gly	Leu	Glu	Thr	Val	Gly	Val	Lys	Ile	Asn	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Ile	
330					335				340					345		
CCT	GTC	ACA	GAT	GAA	GAA	CAG	ACC	AAT	GTG	CCT	TAC	ATC	TAT	GCC	ATT	1152
Pro	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Gln	Thr	Asn	Val	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Ile	
				350				355					360			
GGC	GAT	ATA	TTG	GAG	GAT	AAG	GTG	GAG	CTC	ACC	CCA	GTT	GCA	ATC	CAG	1200
Gly	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Lys	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Ile	Gln	
				365				370					375			
GCA	GGA	AGA	TTG	CTG	GCT	CAG	AGG	CTC	TAT	GCA	GGT	TCC	ACT	GTC	AAG	1248
Ala	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Lys	
				380				385				390				
TGT	GAC	TAT	GAA	AAT	GTT	CCA	ACC	ACT	GTA	TTT	ACT	CCT	TTG	GAA	TAT	1296
Cys	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Thr	Pro	Leu	Glu	Tyr	
				395				400				405				
GGT	GCT	TGT	GGC	CTT	TCT	GAG	GAG	AAA	GCT	GTG	GAG	AAG	TTT	GGG	GAA	1344
Gly	Ala	Cys	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Lys	Phe	Gly	Glu	
410					415				420					425		
GAA	AAT	ATT	GAG	GTT	TAC	CAT	AGT	TAC	TTT	TGG	CCA	TTG	GAA	TGG	ACG	1392
Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	His	Ser	Tyr	Phe	Trp	Pro	Leu	Glu	Trp	Thr	
				430				435					440			
ATT	CCG	TCA	AGA	GAT	AAC	AAC	AAA	TGT	TAT	GCA	AAA	ATA	ATC	TGT	AAT	1440
Ile	Pro	Ser	Arg	Asp	Asn	Asn	Lys	Cys	Tyr	Ala	Lys	Ile	Ile	Cys	Asn	
				445				450				455				
ACT	AAA	GAC	AAT	GAA	CGT	GTT	GTG	GGC	TTT	CAC	GTA	CTG	GGT	CCA	AAT	1488
Thr	Lys	Asp	Asn	Glu	Arg	Val	Val	Gly	Phe	His	Val	Leu	Gly	Pro	Asn	
				460				465				470				
GCT	GGA	GAA	GTT	ACA	CAA	GGC	TTT	GCA	GCT	GCG	CTC	AAA	TGT	GGA	CTG	1536
Ala	Gly	Glu	Val	Thr	Gln	Gly	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Cys	Gly	Leu	
				475				480				485				
ACC	AAA	AAG	CAG	CTG	GAC	AGC	ACA	ATT	GGA	ATC	CAC	CCT	GTC	TGT	GCA	1584
Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Gly	Ile	His	Pro	Val	Cys	Ala	
490					495				500					505		

GAG GTA TTC ACA ACA TTG TCT GTG ACC AAG CGC TCT G G GCA AGC ATC 1632  
 Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser G y Ala Ser Ile  
                   510                  515                  520  
 CTC CAG GCT GGC TGC TGA GGT TAA 1656  
 Leu Gln Ala Gly Cys Xaa Gly  
                   525

配列番号: 7

配列の長さ: 551

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

## 配列

Met Ser Cys Glu Asp Gly Arg Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ser Glu Leu  
 -23          -20                  -15                  -10  
 Ala Ala Glu Thr Asp Leu Pro Val Val Phe Val Lys Gln Arg Lys Ile  
           -5                          1                  5  
 Gly Gly His Gly Pro Thr Leu Lys Ala Tyr Gln Glu Gly Arg Leu Gln  
   10                          15                  20                  25  
 Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu Asp Leu Pro Lys Ser Tyr Asp  
                           30                  35                  40  
 Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Ala Ala  
                           45                  50                  55  
 Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val Leu Asp Phe Val  
           60                          65                  70  
 Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val  
       75                          80                  85  
 Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu  
   90                          95                  100                105  
 Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp Lys Val Glu Glu  
                           110                  115                120  
 Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala Val Gln Asn His  
           125                          130                135  
 Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu Arg Glu Lys Lys  
           140                          145                150  
 Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly Pro His Arg Ile  
       155                          160                165  
 Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr Ser Ala Glu Arg  
   170                          175                180                185  
 Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Gly  
                           190                195                200  
 Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe Ser Leu Pro Tyr  
           205                          210                215  
 Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu  
           220                          225                230  
 Cys Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Val Thr Val Met Val  
       235                          240                245  
 Arg Ser Ile Leu Leu Arg Gly Phe Asp Gln Asp Met Ala Asn Lys Ile  
   250                          255                260                265  
 Gly Glu His Met Glu Glu His Gly Ile Lys Phe Ile Arg Gln Phe Val  
                           270                275                280  
 Pro Ile Lys Val Glu Gln Ile Glu Ala Gly Thr Pro Gly Arg Leu Arg  
           285                          290                295

Val Val Ala Gln Ser Thr Asn Ser Glu Glu Ile Ile Glu Gly Glu Tyr  
 300 305 310  
 Asn Thr Val Met Leu Ala Ile Gly Arg Asp Ala Cys Thr Arg Lys Ile  
 315 320 325  
 Gly Leu Glu Thr Val Gly Val Lys Ile Asn Glu Lys Thr Gly Lys Ile  
 330 335 340 345  
 Pro Val Thr Asp Glu Glu Gln Thr Asn Val Pro Tyr Ile Tyr Ala Ile  
 350 355 360  
 Gly Asp Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu Leu Thr Pro Val Ala Ile Gln  
 365 370 375  
 Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Gly Ser Thr Val Lys  
 380 385 390  
 Cys Asp Tyr Glu Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr  
 395 400 405  
 Gly Ala Cys Gly Leu Ser Glu Glu Lys Ala Val Glu Lys Phe Gly Glu  
 410 415 420 425  
 Glu Asn Ile Glu Val Tyr His Ser Tyr Phe Trp Pro Leu Glu Trp Thr  
 430 435 440  
 Ile Pro Ser Arg Asp Asn Asn Lys Cys Tyr Ala Lys Ile Ile Cys Asn  
 445 450 455  
 Thr Lys Asp Asn Glu Arg Val Val Gly Phe His Val Leu Gly Pro Asn  
 460 465 470  
 Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Ala Ala Leu Lys Cys Gly Leu  
 475 480 485  
 Thr Lys Lys Gln Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ile His Pro Val Cys Ala  
 490 495 500 505  
 Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser Gly Ala Ser Ile  
 510 515 520  
 Leu Gln Ala Gly Cys Xaa Gly  
 525

配列番号：8  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖

## 配列

CATAGGATGC TCCAACAA

18

トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 ハイボセティカル：No  
 アンチセンス：Yes

配列番号：9  
 配列の長さ：24  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖

## 配列

TCATTCCAAG TTGTGTTTGT GAAA

24

トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 ハイボセティカル：No  
 アンチセンス：No

配列番号：10  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖

## 配列

GGTCAGCACA AATTCCA

18

トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 ハイボセティカル：No  
 アンチセンス：No

配列番号：11  
 配列の長さ：24

配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）

## 配列

AAACACAAC TGAATGAAC AATT

24

配列番号：12  
配列の長さ：30  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

ハイボセティカル：No  
アンチセンス：Yes

## 配列

GGTCAGCACA AATTCCAGG AAAAGAGTTC

30

配列番号：13  
配列の長さ：39  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：No

## 配列

GCCGTTTCATT TTTAGTAGCT TTGCTTGGA TGAACAATT

39

配列番号：14  
配列の長さ：39  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：Yes

## 配列

AATTGTTTCAT TCCAAGCAAA GCTACTAAAA ATGAACGGC

39

配列番号：15  
配列の長さ：30  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：No

## 配列

TTAGCAGCTG CCAGACCTCC TGAGCCACCT

30

配列番号：16  
配列の長さ：10  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：蛋白質

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：Yes

フラグメント型：N末端フラグメント

## 配列

Ala Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu

1

5

10

配列番号：17  
配列の長さ：11  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：蛋白質

フラグメント型：C末端フラグメント

## 配列

Arg Ser Gly Ala Ser Ile Leu Gln Ala Gly Cys

1

5

10

配列番号：18  
配列の長さ：54  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：No

## 配列

GCTCTGGGGC AAGCATCCTC CAGGCTGGCT GCTGAGGTTA ACCTCGAGTC TAGA

54

配列番号：19  
配列の長さ：54  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：Yes

## 配列

TCTAGACTCG AGGTTAACCT CAGCAGCCAG CCTGGAGGAT GCTTGCCCCA GAGC

54

配列番号：20  
配列の長さ：54  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：No

## 配列

GGTTAACATC GGTTCAGGT CTGCACCAAT CTTAACCTAA TGGCGCCTCG AGTC 54

配列番号：21  
配列の長さ：54  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：Yes

## 配列

GACTCGAGGC GCCATTAGGT TAAGATTGGT GCA  
GACCTGC AACCGATGTT AACC 54

配列番号：22  
配列の長さ：13  
配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：蛋白質  
フラグメント型：C末端フラグメント

## 配列

Arg Ser Gly Ala Ser Ile Leu Gln Ala Gly Cys Xaa Gly  
1 5 10

配列番号：23  
配列の長さ：49  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：No

## 配列

AACAACGGTA GCAAGTCTTG CTCCAACATT TGTTAGACCT GCAGCGCTC 49

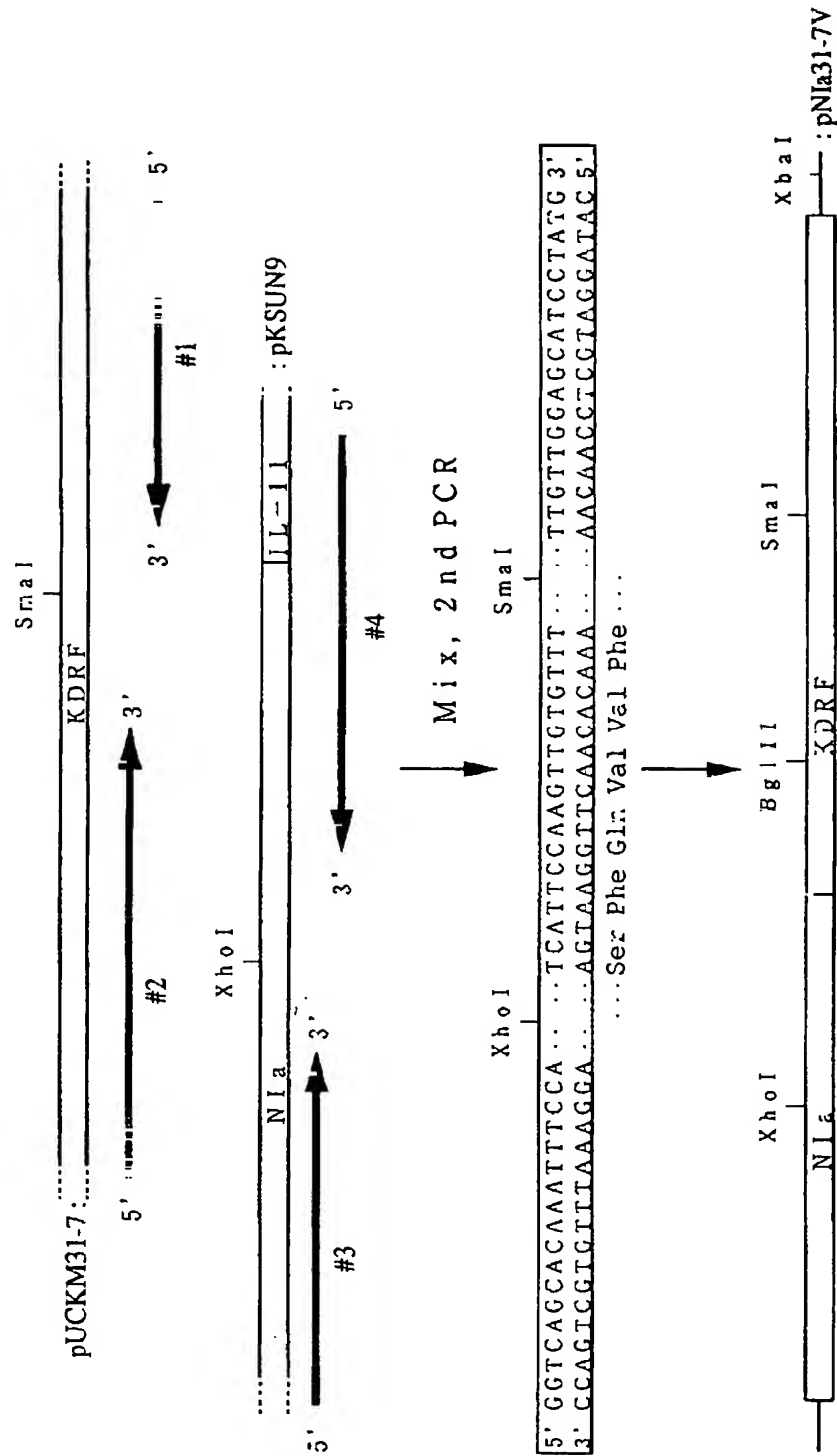
配列番号：24  
配列の長さ：54  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
ハイボセティカル：No  
アンチセンス：Yes

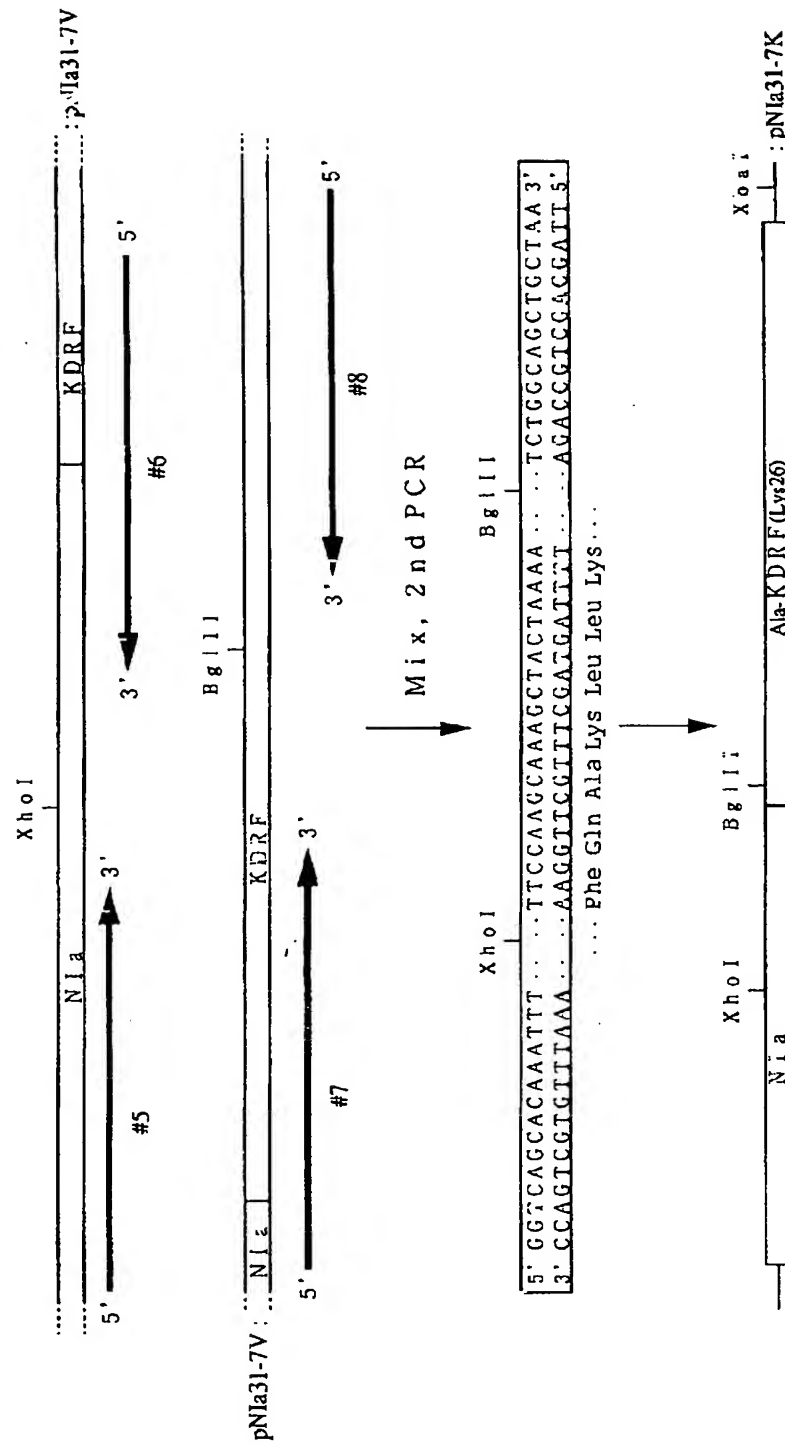
## 配列

CTCGAGAGCG CTGCAGGTCT AACAAATGTT GGA  
GCAAGAC TTGCTACCGT TGTT 54

【図1】



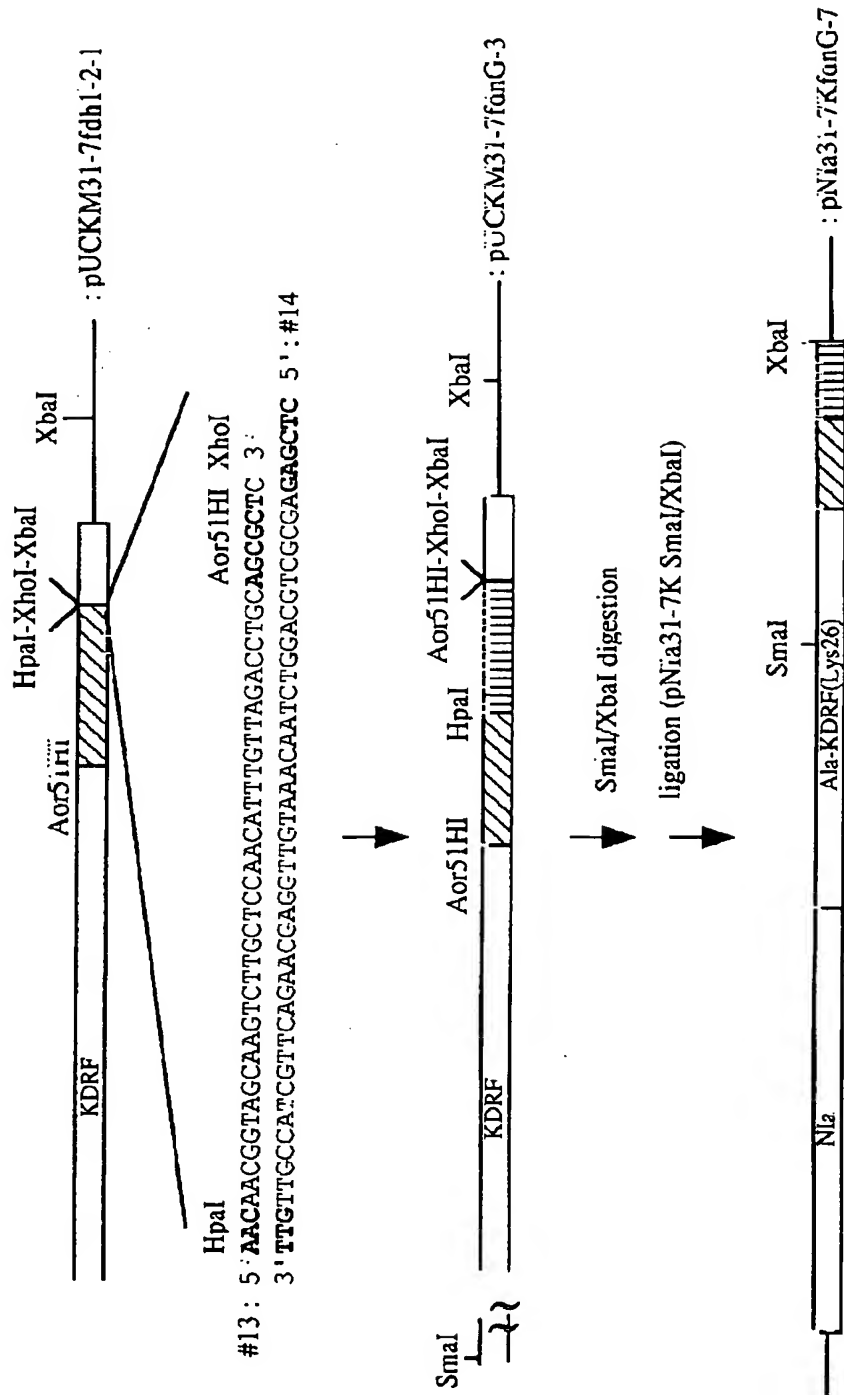
【図2】







【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 38/16

識別記号

ADP

ADU

AED

AGZ

FI

A 6 1 K 37/14

ABL

ABY

ACS

ADP

ADU

AED

AGZ

C 0 7 H 21/04

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)